

**МЕХАНИЗМЫ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО С ДНК**

**П. О. Вардеванян<sup>\*</sup>, А. П. Антонян, М. А. Парсаданян,  
М. А. Шагинян, Л. А. Амбарцумян**

УДК 577.336

Ереванский государственный университет, Армения,  
0025, Ереван, ул. Алека Манукяна, 1; e-mail: biophys\_dep@mail.ru

(Поступила 14 марта 2013)

Исследовано взаимодействие метиленового синего (МС) с ДНК тимуса теленка абсорбционным и флуориметрическими методами. На основании скетчард-анализа экспериментальных данных построена кривая связывания МС с ДНК. Эта кривая состоит из двух прямолинейных участков, что указывает на два типа взаимодействия, для которых определены константы  $K$  и число мест  $n$  связывания этого лиганда с ДНК. Сравнение полученных данных с аналогичными величинами, найденными при взаимодействии бромистого этидия с ДНК, позволило сделать вывод, что МС взаимодействует с ДНК двумя способами — сильным (полуинтеркаляционным) и слабым (электростатическим).

**Ключевые слова:** ДНК, метиленовый синий, интеркаляция, полуинтеркаляция, электростатическое связывание.

*The interaction of methylene blue (MB) with calf thymus DNA has been investigated by absorption and fluorometric methods. Based on the Scatchard analysis of experimental data, the binding curve of MB to DNA has been constructed. This curve has been revealed to be composed of two linear regions that indicate two types of the interaction, for which both the binding constant,  $K$ , and the binding site number,  $n$ , have been determined. A comparison of the obtained data with analogous values determined for the interaction of ethidium bromide with DNA makes it possible to conclude that MB interacts with DNA through two mechanisms — strong (semi-intercalation) and weak (electrostatic).*

**Keywords:** DNA, methylene blue, intercalation, semi-intercalation, electrostatic binding.

**Введение.** Взаимодействие низкомолекулярных веществ — лигандов — с ДНК в настоящее время представляет большой интерес, поскольку большинство процессов с участием ДНК происходит в окружении различных неорганических и органических соединений, в том числе лекарственных. С этой точки зрения исследования по взаимодействию лигандов с различными формами ДНК важны и для синтеза новых лекарственных препаратов, связывающихся с ней и влияющих на ее функционирование [1, 2]. Нековалентное взаимодействие лигандов с ДНК включает в себя электростатическое, желобковое и интеркаляционное связывания [1—7]. Если лиганд в растворе находится в катионной форме, то он может взаимодействовать с отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК электростатически. Это взаимодействие неспецифично и обычно происходит на внешней стороне двойной спирали ДНК вдоль ее цепи. При этом число молекул лиганда, связанных с фосфатными группами ДНК, намного больше, чем в случае интеркаляции или локализации в одном из желобков неинтеркаляционным способом [3].

Неинтеркаляционное связывание в желобке в основном включает в себя взаимодействие молекул лиганда с основаниями ДНК и образование водородных связей или ван-дер-ваальсовых контактов в большом или малом желобке ДНК [6, 7]. Интеркаляция же происходит за счет образования стекнинг-контактов с парами оснований. Это приводит к раскручиванию ДНК, поскольку для интеркаляции необходимо, чтобы две пары оснований удалялись друг от друга. При этом другие параметры торсионных углов изменяются так, чтобы молекулы интеркалятора поместились в пространстве между двумя парами оснований [8, 9]. Таким образом, интеркаляция индуцирует существенные искажения в структуре ДНК и увеличение потенциальной энергии. При интеркаляции происходят излом, смещение осей спирали ДНК и нарушение стэкинга. Однако нарушение стэкинга между парами оснований компенсируется образованием новых ван-

**MECHANISMS OF BINDING BETWEEN METHYLENE BLUE AND DNA**

**P. O. Vardevanyan<sup>\*</sup>, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, M. A. Shahinyan, and L. A. Hambardzumyan**  
(Yerevan State University, 1 Alex Manoogian Str., Yerevan, 0025, Armenia; e-mail: biophys\_dep@mail.ru)

дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий между парами оснований и ароматическим интеркалированным кольцом лиганда [8].

Среди нековалентно связывающихся лигандов определенный интерес представляет метиленовый синий (МС). Благодаря фотосенсибилизирующим свойствам этот лиганд широко применяется в медицине, в том числе в фотодинамической терапии (ФДТ) [10—18]. Связываясь с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами, МС может поглощать свет, переходить в фотоактивное состояние и взаимодействовать с кислородом. Вследствие этого кислород переходит в синглетное состояние, что вызывает повреждения в биомолекулах. Этот факт лежит в основе разработки производных МС, способных вызывать сайт-направленные разрывы в нитях ДНК [10, 11, 19]. Полагается, что указанный лиганд благодаря планарной структуре, идентичной акридиновым красителям, связывается с ДНК интеркаляционным механизмом, однако достоверность этого факта полностью еще не подтверждена [16]. Спектроскопические и электрохимические исследования МС и его производных с ДНК выявляют, что возможно также электростатическое связывание [14, 15]. Это обусловлено тем, что при низких ионных силах раствора МС должен интеркалировать в ДНК, в то время как с увеличением концентрации соли МС одновременно с интеркаляцией внешне связывается с ДНК [12, 13].

В настоящей работе подробно исследованы характеристики взаимодействия МС с ДНК тимуса теленка и проведено их сравнение с аналогичными характеристиками бромистого этидия (БЭ) при связывании с ДНК. Обсуждаются также механизмы взаимодействия МС с ДНК.

**Эксперимент.** Использованы ДНК тимуса теленка (Sigma, США), МС (Aldrich, США), NaCl, Na-цитрат (с.ч.) без дополнительной очистки, их концентрации определены абсорбционным методом на основании следующих коэффициентов экстинкции: ДНК тимуса теленка  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , МС  $\epsilon_{664} = 76000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Исследования выполнены при концентрации  $\text{Na}^+$  0.02 М и температуре 25 °С.

Спектроскопические измерения проводили на спектрофотометре UV Vis Specord 50 (Analytik Jena, Германия), Unicam SP8-100 (Англия), спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия), используя кварцевые кюветы объемом 3 мл с оптической длиной пути 1 см. Титрование растворов образцов проводили микропипеткой объемом 10 мкл (Hamilton, США).

Для получения спектров поглощения концентрация МС в растворе оставалась постоянной, а концентрация ДНК возрастала по ходу титрования. Спектры МС и его комплексов с ДНК измеряли в диапазоне 220—750 нм. Максимумы поглощения чистого МС  $\lambda_{\text{max}} = 270$  и 664 нм. По ходу спектрофотометрического титрования максимум поглощения МС при  $\lambda = 664$  нм уменьшается по мере увеличения концентрации ДНК. Растворы для измерений интенсивности флуоресценции приготовлены так же, как для измерения спектров поглощения. Спектры флуоресценции МС зарегистрированы в области 300—750 нм при  $\lambda_{\text{возб}} = 290$  нм. Изотерма адсорбции построена на основании спектров поглощения и флуоресценции МС и его комплексов с ДНК [20].

**Результаты и их обсуждение.** Одной из особенностей МС является то, что он поглощает свет в длинноволновой области ( $\lambda = 668$  нм) и флуоресцирует, причем флуоресценция регистрируется в этой же области (500—1000 нм). Это можно объяснить тем, что энергия возбуждения при переходе электронов в невозбужденное стационарное состояние в основном излучается в виде света с небольшими потерями. На рис. 1, а представлены спектры флуоресценции чистого МС и его комплексов с ДНК. Спектры флуоресценции получены в интервале длин волн  $300 \leq \lambda \leq 750$  нм, однако на рис. 1 приведены спектры флуоресценции МС и его комплексов с ДНК в интервале  $500 \leq \lambda \leq 750$  нм, так как при  $\lambda_{\text{возб}} = 290$  нм пики проявляются в этом интервале. При аналогичных исследованиях возбуждение обычно проводится при длинах волн, наиболее близких к самому длинноволновому пику испускания [18]. Однако при  $\lambda_{\text{возб}} = 290$  нм в спектре флуоресценции чистого МС наряду с пиком при 682 нм появляется еще пик 583 нм. Обычно спектры флуоресценции многоатомных органических соединений однополосные, если отсутствует процесс эксимеризации [21]. При этом пики, появляющиеся при эксимеризации, сдвинуты в сторону более длинных волн по сравнению с основным пиком. При выбранных нами концентрациях МС ( $\sim 10^{-6}$  моль/л) димеризация или эксимеризация не наблюдается (длинноволновые пики отсутствуют), следовательно, наличие двух пиков эмиссии указывает на особенности спектра флуоресценции этого соединения.

С увеличением концентрации ДНК в растворе наблюдается тушение флуоресценции МС при 682 нм. В работе [18] показано, что тушение флуоресценции МС при комплексообразовании с ДНК обусловлено интеркаляцией молекул лиганда в двухцепочечную структуру макромолекулы, вследствие чего имеет место перенос энергии возбуждения от молекул МС к ДНК. Уменьшение интенсивности максимума флуоресценции при 583 нм наблюдается также при низких концентрациях ДНК ( $[\text{МС}]/[\text{ДНК}] \geq 0.2$ ). Однако при возрастании концентрации ДНК ( $[\text{МС}]/[\text{ДНК}] < 0.2$ ) интенсивность флуоресценции на 583 нм начинает монотонно увеличиваться (рис. 1, а, кривые 2—12). Уменьшение интенсивности флуоресценции может

быть результатом значительного вклада электростатического способа при больших соотношениях  $[МС]/[ДНК]$ , что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции как при 682 нм, так и при 583 нм. По мере увеличения концентрации ДНК, скорее всего, начинают проявляться другие способы связывания, вызывающие уменьшение интенсивности флуоресценции в относительно длинноволновой (682 нм) области и увеличение в более коротковолновой (583 нм).

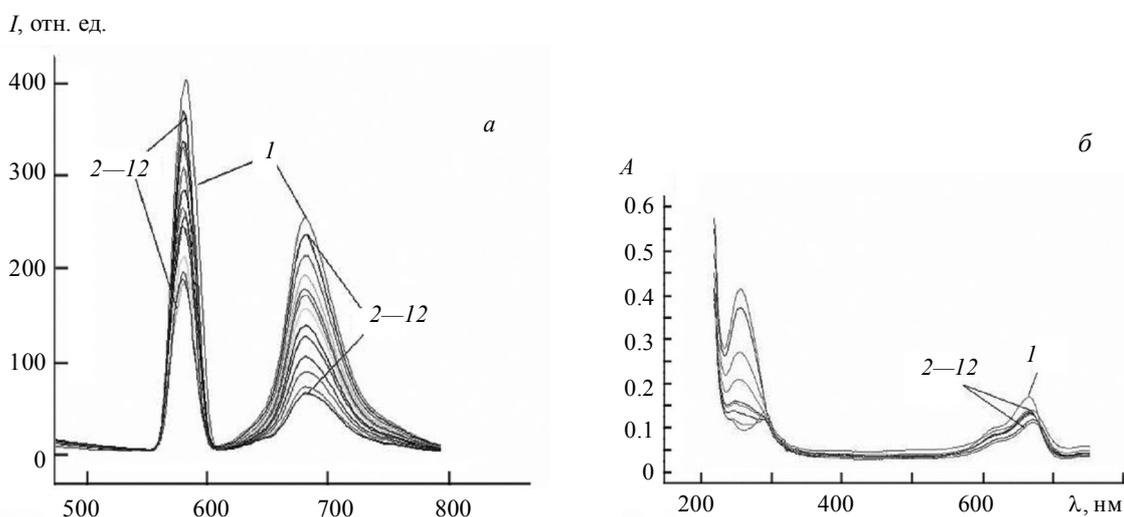


Рис. 1. Спектры флуоресценции  $\lambda_{\text{возб}} = 290$  нм (а) и поглощения (б) чистого МС (1) и комплексов МС-ДНК (2—12) в интервале изменения соотношения  $0.03 \leq [МС]/[ДНК] \leq 1.0$  при pH 7.0,  $T = 25$  °C,  $[Na^+] = 0.02$  М; концентрация МС в растворе  $1.6 \cdot 10^{-6}$  М

Комплексообразование МС с ДНК исследовано также абсорбционным методом. На рис. 1, б приведены спектры поглощения МС с ДНК. Как видно, в спектрах поглощения МС в видимой области имеется максимум при 664 нм с плечом ~620 нм (кривая 1). С увеличением количества ДНК поглощение МС уменьшается (гипохромный эффект). При этом при относительно больших ( $\geq 0.2$ ) соотношениях  $[МС]/[ДНК]$  в основном проявляется гипохромный эффект, в то время как сдвиг  $\lambda_{\text{max}}$  практически отсутствует. При увеличении концентрации ДНК ( $[МС]/[ДНК] < 0.2$ ) наряду с гипохромным эффектом обнаруживается длинноволновый сдвиг (почти 3 нм). Известно, что красный сдвиг и гипохромный эффект обычно наблюдаются в спектрах поглощения при интеркаляции лигандов в ДНК. В частности, в случае БЭ спектры поглощения комплексов сдвинуты в сторону длинных волн по сравнению со спектрами чистых лигандов на  $\approx 40$ —50 нм [20]. Исходя из этого, полагаем, что в случае МС при относительно больших значениях  $r$  ( $r$  — число нуклеотидов ДНК, находящихся в комплексе с лигандом) отсутствует полная интеркаляция молекул лиганда в двухцепочечную структуру ДНК.

На основании спектров флуоресценции и абсорбции получены кривые связывания МС с ДНК в координатах Скетчарда — зависимость  $r/C_f$  от  $r$  ( $C_f$  — концентрация несвязанных молекул лиганда в растворе). Кривые связывания МС с ДНК приведены на рис. 2, а также для сравнения — кривые связывания БЭ с ДНК из [20]. Необходимо отметить, что экспериментальные точки, полученные из анализа флуориметрических и абсорбционных данных, совпали, поэтому приведена обобщенная кривая. Как видно, кривая связывания нелинейная и состоит из двух прямолинейных участков, соответствующих двум способам взаимодействия. Один из них сильный и характеризуется константой связывания  $\sim 6.5 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup> и числом оснований  $\sim 6$ , соответствующих одному месту связывания. Второй, более слабый, с константой связывания  $\sim 1.5 \cdot 10^5$  и числом оснований  $\sim 2$ , соответствующих одному месту связывания.

Сравнительный анализ данных, полученных из кривых адсорбции, выявляет, что в случае БЭ имеют место по крайней мере три способа связывания, поскольку кривые, полученные на основании абсорбционных (рис. 2, б, кривая 2) и флуориметрических (кривая 1) результатов, различаются. При этом кривая 2 нелинейная, что обусловлено существованием по крайней мере двух (или больше) типов взаимодействия, в то время как кривая 1 прямолинейная. Прямолинейность кривых связывания в координатах Скетчарда указывает на то, что либо существует только одно место связывания, либо число мест связывания больше одного, однако они идентичны и независимы, т. е. связывание одной молекулы лиганда с одним из этих мест не влияет на связывание второй молекулы с другим (другими) местом. Прямолинейность кривой свя-

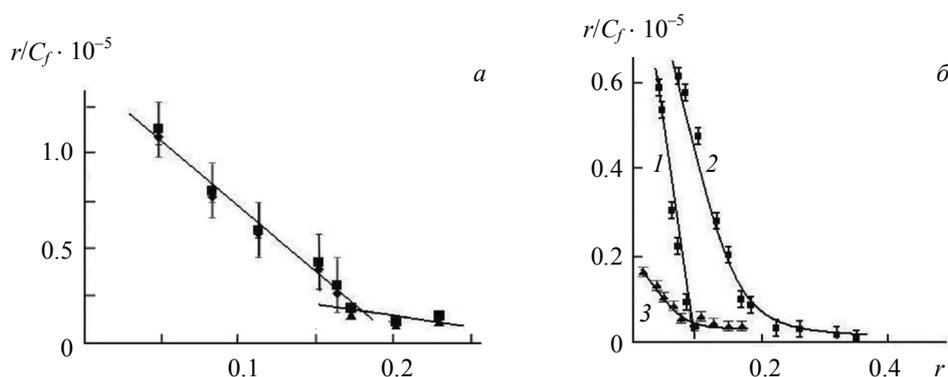


Рис. 2. Кривая связывания МС с ДНК (а) в координатах Скетчарда, полученная из спектров флуоресценции и поглощения (рис. 1), и кривые связывания БЭ с ДНК (б) в координатах Скетчарда, полученные на основании флуориметрических (1) и абсорбционных данных (2) (кривые взяты из [20]), рН 7.0,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\text{Na}^+] = 0.02\text{ M}$

зывания БЭ с двухцепочечной ДНК, полученной флуориметрическим методом, указывает на то, что в данном случае имеет место только один способ связывания. Поскольку этим методом регистрируется только флуоресценция молекул, которые в связанном состоянии экранированы от молекул воды, можно полагать, что прямолинейная кривая связывания БЭ с ДНК соответствует только полностью интеркалированным молекулам лиганда. В то же время кривая 2 анализировалась исходя из факта осуществления взаимодействий более чем одним способом. Различие же кривых 1 и 2 можно объяснить присутствием нефлуоресцирующих молекул БЭ на ДНК, которые регистрируются только абсорбционным методом. Фактически кривая 2 отражает сумму всех способов связывания, следовательно, вычитанием кривой 1 из кривой 2 количественно можно оценить вклад нефлуоресцирующего комплекса при определении параметров связывания. Таким образом получена кривая 3, которая соответствует нефлуоресцирующим комплексам БЭ с ДНК. Более того, кривая 3 также нелинейная, следовательно, на ДНК образуются по крайней мере два типа нефлуоресцирующих комплексов — сильный, соответствующий полуинтеркаляционному механизму [22, 23], и слабый. Как видно, кривая 3 состоит из двух прямолинейных участков. Из кривых 1—3 определены значения  $K$  и  $n$ . Соответствующее интеркаляционному способу связывания БЭ с ДНК значение  $K = 1.3 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$  практически на два порядка больше, чем константа связывания электростатическим способом ( $\sim 1.6 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}$ ), и на порядок больше, чем константа связывания полуинтеркаляционным способом ( $\sim 3.0 \cdot 10^5\text{ M}^{-1}$ ) [20]. При этом значение  $K$ , соответствующее сильному способу связывания МС с ДНК, практически совпадает с константой, соответствующей полуинтеркаляционному способу связывания БЭ с ДНК. Хорошее согласие получается также при сравнении значений  $n$ , соответствующих сильному способу связывания МС и полуинтеркаляционному способу связывания БЭ с ДНК. Более того, в [18] показано, что отношение  $F_0/F$  ( $F_0$  и  $F$  — интенсивности флуоресценции МС в отсутствие и в присутствии ДНК) изменяется линейно с увеличением концентрации ДНК, при этом в случае двухцепочечной ДНК  $K_{SV} = 4.56 \cdot 10^4\text{ л/моль}$ , в случае одноцепочечной ДНК —  $1.95 \cdot 10^4\text{ л/моль}$ . Этот факт подтверждает, что МС с двух- и одноцепочечной ДНК может связываться одинаковым способом, как получено в случае БЭ в [20].

**Заключение.** Сравнение экспериментальных данных, полученных для комплексов ДНК с бромистым этидием и ДНК с метиленовым синим, позволяет сделать вывод, что метиленовый синий с ДНК, скорее всего, взаимодействует полуинтеркаляционным способом. Эти данные могут быть отражением того, что метиленовый синий, как и некоторые лиганды, например бромистый этидий и др., проявляет мультимодальность при взаимодействии с ДНК [20, 22—24].

- [1] П. О. Вардеванян, А. П. Антоян. Биолог. журн. Армении, **62**, № 3 (2010) 50—58  
 [2] A. N. Lane, T. C. Jenkins. Rev. Biophys., **33**, N 3 (2000) 255—306  
 [3] B. Jayaram, D. L. Beveridge. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **25** (1996) 367—394  
 [4] P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, H. G. Davtyan, Z. R. Boyajyan, A. T. Karapetian. J. Biomol. Struct. Dyn., **22**, N 4 (2005) 465—470  
 [5] Sh. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault, H.-A. Tajmir-Riahi. J. Mol. Struct., **827** (2007) 35—43  
 [6] F. Han, N. Taulier, T. Chalikian. Biochem., **44** (2005) 9785—9794

- [7] **M. A. Ismail, P. M. Rodger, A. Rodger.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **11** (2000) 335—348
- [8] **J. B. Chaires.** *Biopolymers*, **44** (1998) 201—215
- [9] **A. N. Lane.** ACS Symposium Series 682, *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, Eds. Leontis, N.B. & Santa-Lucia J. (1998) 106—121
- [10] **M. N. Usacheva, M. C. Teichert, M. A. Biel.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **71** (2003) 87—98
- [11] **K. Orth, G. Beck, F. Genze, A. Ruck.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **57** (2000) 186—192
- [12] **R. Rohs, H. Sklenar, R. Lavery, B. Roder.** *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000) 2860—2866
- [13] **R. Rohs, H. Sklenar.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **21**, N 5 (2004) 699—711
- [14] **G. C. Zhao, J. J. Zhu, H. Y. Chen.** *Spectrochim. Acta, A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **55** (1999) 1109—1117
- [15] **G. C. Zhao, J. J. Zhu, J. J. Zhang, H. Y. Chen.** *Analyt. Chim. Acta*, **394** (1999) 337—344
- [16] **M. Hossain, P. Giri, G. S. Kumar.** *DNA and Cell Biology*, **27**, N 2 (2008) 81—90
- [17] **L. Zhu, R. Zhao, K. Wang, H. Xiang, Zh. Shang, W. Sun.** *Sensors*, **8** (2008) 5649—5660
- [18] **T. Changlun, H. Zhou, W. Jianmin.** *J. Fluores.*, **20** (2010) 261—267
- [19] **E. M. Tuite, J. M. Kelly.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **21** (1993) 103—124
- [20] **P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, H. G. Davtyan, A. T. Karapetyan.** *Exper. Mol. Medicine*, **35**, N 6 (2003) 527—533
- [21] **Д. Фрайфелдер.** *Физическая биохимия*, Москва, Мир (1980)
- [22] **А. Н. Веселков, С. Ф. Барановский, Л. Н. Дымант, Н. В. Петренко, Д. А. Веселков, А. Такер, Д. Б. Дэвис.** *Молек. биология*, **31**, № 2 (1997) 263—273
- [23] **R. M. Wadkins, A. E. Jares-Erijman, R. Klement, A. Rudiger, T. M. Jovin.** *J. Mol. Biol.*, **262** (1996) 53—68
- [24] **R. R. Monaco.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **25**, N 2 (2007) 119—125