

КАТИОННЫЕ МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫЕ ТИАКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В КАЧЕСТВЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ДНК

Пронкин П.Г., Шведова Л.А., Татиколов А.С.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, д. 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: pronkinp@gmail.com

Поступила в редакцию: 13.06.18

Аннотация. Изучены спектрально-флуоресцентные свойства новых катионных тиакарбоцианиновых красителей – 3,3'-диметил-9-фенилтиакарбоцианин-иодида (ДФТЦ) и его аналога 3,3'-диэтил-9-(2-гидрокси-4-метоксифенил)тиакарбоцианин-иодида (ДМФТЦ). Несмотря на наличие объёмных заместителей в мезо-положении полиметиновой цепи эти красители в растворах находятся в формах *транс*-изомеров независимо от полярности растворителя. В растворе фосфатного буфера красители образуют нековалентные комплексы с ДНК. Взаимодействие с ДНК протекает с образованием комплексов красителей как в мономерной, так и в агрегированной форме и сопровождается изменениями спектрально-флуоресцентных свойств красителей. Взаимодействие мономерных молекул ДФТЦ и ДМФТЦ с ДНК не приводит к сдвигу изомерного равновесия в сторону *цис*-изомера и протекает преимущественно через *транс*-изомер. Методом импульсного фотолиза изучено триплетное состояние молекул красителей, связанных в комплекс с ДНК. Повышение температуры плавления ДНК свидетельствуют в пользу образования красителями ДФТЦ и ДМФТЦ комплексов интеркаляции.

Ключевые слова: тиакарбоцианиновые красители, ДНК, нековалентный комплекс, спектрально-флуоресцентные зонды, импульсный фотолиз, интеркаляция.

Цианиновые красители обладают интересными спектрально-флуоресцентными свойствами [1, 2], наличие гибкой полиметиновой цепи определяет быструю безызлучательную дезактивацию энергии возбужденного электронного состояния, эффективно конкурирующую с процессами флуоресценции и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ($S_1 \rightarrow T$) [2]. За счет вращения фрагментов молекул красителей вокруг связей полиметиновой цепи возможна *цис-транс*-изомеризация [1, 2]. Для карбоцианиновых красителей, имеющих заместители в мезо-положении полиметиновой цепи, в растворах наблюдается равновесие между их полностью *транс*- и *цис*-изомерами [1-3].

Цианиновые красители способны образовывать нековалентные комплексы с белками и нуклеиновыми кислотами, при этом свойства красителей резко изменяются [1, 2, 4, 5]. Комплексообразование приводит к росту квантовых выходов флуоресценции (и триплетного состояния) связанных молекул красителей, что делает возможным их использование в качестве спектрально-флуоресцентных и фотохимических зондов [2, 5-8]. В этом качестве перспективны мезо-замещенные тиакарбоцианиновые красители, поскольку спектрально-флуоресцентные свойства *транс*- и *цис*-изомеров красителей существенно различаются [1, 2, 4, 6-8].

Таким образом, для разработки новых зондов на биомолекулы актуальным является изучение взаимодействия мезо-замещенных тиакарбоцианинов с биомолекулами и исследование их фотофизических свойств. В настоящей работе спектрально-флуоресцентными методами изучалось взаимодействие с ДНК *in vitro* двух мезо-замещенных тиакарбоцианиновых красителей (рис. 1): 3,3'-диметил-9-фенилтиакарбоцианин-иодида (ДФТЦ) и его аналога 3,3'-диэтил-9-(2-гидрокси-4-метоксифенил)тиакарбоцианин-иодида (ДМФТЦ).

Методика эксперимента. В работе использовали красители, любезно предоставленные научным центром НИИХИМФОТОПРОЕКТ и Институтом органической химии РАН. Использовалась коммерческая ДНК цыпленка (Реанал, Венгрия). Концентрация ДНК определялась спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции пары оснований $\epsilon = 13200 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\lambda = 260 \text{ нм}$ [9]. В качестве растворителей использовали водный раствор фосфатного буфера (рН 7, 20 ммоль л⁻¹), этанол, ацетонитрил, диметилсульфоксид, 1,4-диоксан (ч.д.а.). Измерения спектров поглощения красителей проводились на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), флуоресцентные измерения – на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия). Квантовые выходы флуоресценции красителей (ϕ_f) определялись путем сравнения со стандартом (3,3'-диэтилтиакарбоцианин-иодид, ДТЦ, $\phi_{f,DTIC} = 5\%$ в этаноле [10]).

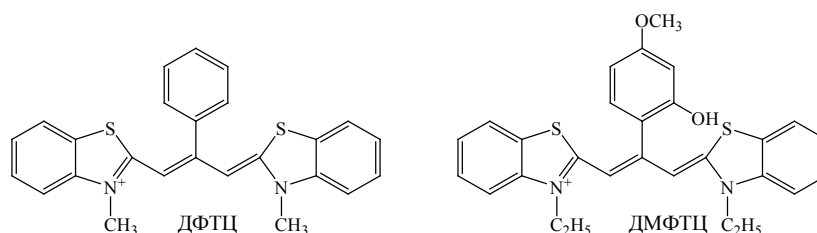


Рисунок 1. Структурные формулы исследованных красителей

Для изучения триплетного состояния красителей в присутствии ДНК ($c_{\text{ДНК}} \sim 4,0 \times 10^{-4}$ моль л⁻¹) использовали установку импульсного фотолиза с возбуждением ксеноновой лампой (энергия 50 Дж, $\tau_{1/2} = 10$ мкс) [7], растворы обескислороживали на вакуумной установке. В экспериментах по тушению триплетных состояний кислородом для определения давления воздуха в рабочей кювете использовалась манометрическая установка.

Эксперименты по температурной денатурации ДНК на спектрофотометре с регистрацией при $\lambda = 260$ нм при концентрациях, обеспечивающих насыщение ДНК красителем во всем температурном диапазоне ($c_{\text{ДНК}} = 5,02 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹ $c_{\text{кр}} \sim 1,0 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹). Температуру измеряли путем введения термпары (медь-константан) в кювету.

Наблюдаемые константы комплексообразования красителей с ДНК (K_a , л/моль) определялись по данным спектров флуоресценции с использованием зависимости Скетчарда [11]: $r/c = nK_a - rK_a$, где r – отношение концентрации связанного лиганда (красителя) к концентрации доступных лиганду сайтов связывания ДНК; c – концентрация свободного лиганда, и n – число сайтов связывания в расчете на молекулу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрально-флуоресцентные свойства красителей в растворах. Спектры ДФТЦ и ДМФТЦ были изучены в растворителях различной полярности и в водном растворе фосфатного буфера [12]. Спектры поглощения ДФТЦ и ДМФТЦ представляют собой одиночные полосы с близкими максимумами (в этаноле $\lambda_{\text{max}} = 562$ и 565 нм соответственно) и электронно-колебательным плечом (в этаноле $\lambda_{\text{max}} \sim 525$ нм), при переходе к менее полярным системам (от ацетонитрила и диметилсульфоксида к 1,4-диоксану) наблюдается bathochromный сдвиг максимумов поглощения (~ 12 -15 нм). Для ДФТЦ и ДМФТЦ в растворах наблюдается флуоресценция (в этаноле $\phi_{\text{fl}} = 0,8\%$ и 4% , соответственно). Можно сделать вывод, что красители в растворах присутствуют в форме *транс*-изомеров, т.к. *цис*-изомеры *мезо*-замещенных тиакарбоцианинов практически не флуоресцируют [3]. В спектрах флуоресценции ДФТЦ и ДМФТЦ независимо от полярности среды наблюдается только одна полоса, положения максимумов спектров возбуждения флуоресценции красителей ДФТЦ и ДМФТЦ с разницей в пределах 1 нм соответствуют спектрам поглощения независимо от полярности растворителя.

Поскольку спектры поглощения ДФТЦ и ДМФТЦ близки к спектрам не имеющего *мезо*-заместителя тиакарбоцианинового красителя ДТЦ, который независимо от растворителя находится в *транс*-форме [2, 3], то можно заключить, что исследуемые красители также находятся в растворах в виде *транс*-изомеров.

Влияние ДНК на спектрально-флуоресцентные свойства красителей. Спектры поглощения и флуоресценции красителей ДФТЦ и ДМФТЦ в присутствии ДНК были изучены в растворах фосфатного буфера при различных концентрациях биополимера ($c_{\text{ДНК}} = 0$ -7,5 $\times 10^{-4}$ моль л⁻¹). При низком соотношении $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} < 50$ в спектрах наблюдается существенное падение интенсивности полос поглощения красителей, сопровождающееся увеличением ширины спектров (достигает 130-140 %). Взаимодействие с ДНК также сопровождается длинноволновым сдвигом максимумов полос в спектрах. Эти эффекты проявляются вплоть до $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} < 100$: в случае ДФТЦ (при $c_{\text{ДНК}} = 7,46 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹; $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} = 66,1$) максимум его спектра поглощения сдвигается в длинноволновую область почти на 10 нм по сравнению с исходным спектром ($c_{\text{ДНК}} = 0$ моль л⁻¹), оптическая плотность в максимуме красителя ДФТЦ уменьшается почти в 2 раза [12]. Краситель ДМФТЦ демонстрирует аналогичную картину спектральных изменений в этом диапазоне концентраций ДНК (рис. 2а). Увеличение концентрации ДНК (при $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} > 100$ и выше) приводит к росту наблюдаемого коэффициента экстинкции красителей, ширина полос в спектрах ДФТЦ и ДМФТЦ уменьшается, в случае ДМФТЦ при $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} \sim 200$ достигает исходных значений. При $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} > 100$ положения максимумов полос поглощения ДФТЦ и ДМФТЦ остаются практически постоянными ($\lambda_{\text{max}} = 565$ и 568 нм, соответственно), т.е. увеличение концентрации ДНК не сопровождается дополнительным длинноволновым сдвигом максимумов спектров красителей.

Падение наблюдаемых коэффициентов экстинкции красителей и отсутствие изобестических точек в спектрах поглощения в присутствии ДНК, свидетельствует о том, что комплексообразование не сводится к простому одностадийному равновесию [12]. Взаимодействие красителей с ДНК может, помимо комплексов мономерных молекул красителей [2], приводить к образованию агрегатов красителей на ДНК [4].

В присутствии ДНК наблюдается рост квантового выхода флуоресценции красителей ДФТЦ и ДМФТЦ (при $c_{\text{ДНК}} = 5,0 \times 10^{-4}$ моль л⁻¹ в 10,8 и в 9,3 раз соответственно). При $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} < 50$ наблюдается длинноволновый сдвиг максимумов спектров флуоресценции и спектров возбуждения флуоресценции красителей (достигает 5-7 нм). Поскольку спектры возбуждения флуоресценции ДФТЦ и ДМФТЦ удовлетворительно совпадают со спектрами поглощения красителей, можно сделать вывод, что в присутствии ДНК не происходит сдвигов *цис-транс*-изомерного равновесия (в отличие от других *мезо*-замещенных карбоцианинов [8]) и образуются флуоресцирующие комплексы ДНК и *транс*-изомеров красителей. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции красителей остаются узкими и соответствуют флуоресценции связанных с ДНК мономерных молекул красителей (агрегированные формы не вносят заметный вклад в флуоресценцию [1, 2, 12]).

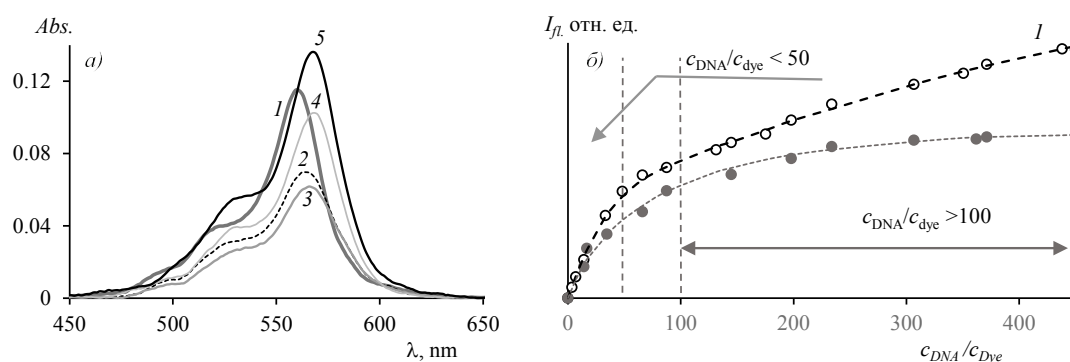


Рисунок 2. (а) Спектры поглощения ДМФТЦ ($c_{\text{ДМФТЦ}} = 1,10 \times 10^{-6}$ моль л^{-1}), полученные в растворе фосфатного буфера при различных концентрациях ДНК: $c_{\text{ДНК}} = 0$ (1), $1,95 \times 10^{-5}$ (2), $3,85 \times 10^{-5}$ (3), $2,70 \times 10^{-4}$ (4), $4,28 \times 10^{-4}$ моль л^{-1} (5); (б) – зависимость относительной интенсивности флуоресценции красителей ДМТЦ (1, $c_{\text{ДМТЦ}} = 1,03 \times 10^{-6}$ моль л^{-1}) и ДМФТЦ (2, $c_{\text{ДМФТЦ}} = 1,10 \times 10^{-6}$ моль л^{-1}) от концентрации ДНК

Оценка величин эффективных констант связывания красителей с ДНК. Из данных спектров флуоресценции по уравнению Скотчарда [11] получены значения эффективных констант комплексообразования (K_{ef}) красителей. Для ДФТЦ $K_{\text{ef1}} = 1,34 \times 10^5$ л моль $^{-1}$, при этом в комплексе на одну молекулу красителя приходится ~ 8 пар оснований ДНК, $K_{\text{ef2}} = 4,84 \times 10^4$ л моль $^{-1}$, при этом на одну молекулу красителя приходится ~ 13 пар оснований ДНК. Для красителя ДМФТЦ $K_{\text{ef1}} = 1,19 \times 10^5$ л моль $^{-1}$ (при соотношении 7-8 пар оснований на одну молекулу лиганда), $K_{\text{ef2}} = 6,57 \times 10^4$ л моль $^{-1}$ (при соотношении ~ 11 пар оснований на одну молекулу лиганда).

Отметим, что мономерные комплексы молекул карбоцианиновых красителей с ДНК также могут относиться к различным типам: комплексы интеркаляции между парами оснований ДНК, и комплексы, в которых связывание происходит в малом желобе двойной спирали ДНК [2, 4]. Согласно литературным данным [13], эффективные константы комплексообразования с ДНК красителей-интеркаляторов не превышают 10^7 л моль $^{-1}$, тогда как константы комплексообразования, полученные при связывании красителей в бороздке двойной спирали ДНК, оказываются выше ($K_{\text{ef}} > 10^8$ л моль $^{-1}$). Невысокие K_{ef} ДФТЦ и ДМФТЦ могут быть обусловлены взаимодействием красителей с ДНК по типу интеркаляции [12].

Свойства триплетного состояния. Взаимодействие с ДНК приводит к возрастанию квантового выхода триплетного состояния красителей. Кинетики гибели Т-состояния красителей в комплексах с ДНК являются двухэкспоненциальными. Константы скорости гибели триплетного состояния (k_1 и k_2) отличаются на порядок (например, для ДФТЦ $k_1 \sim 1,2 \times 10^4$ с $^{-1}$, $k_2 \sim 1,2 \times 10^3$ с $^{-1}$). В комплексах краситель-ДНК различных типов Т-состояние молекул красителя будет, вероятно, обладать различными характеристиками, что будет отражаться в двухэкспоненциальном характере их кинетик [7].

Изучено влияние растворенного кислорода на кинетику гибели Т-состояния ДФТЦ и ДМФТЦ в присутствии ДНК. Аналогично [7], константы скорости тушения (k_{qO_2}) триплетного состояния оказались существенно ниже величин, характерных для диффузионно-контролируемых реакций ($k_{\text{qO}_2} = 1/9$, $k_{\text{dif}} \sim 3,0 \times 10^9$ моль $^{-1}$ л с $^{-1}$ с учетом спин-статистического фактора): для ДФТЦ $k_{\text{qO}_2} = 4,3 \times 10^8$ моль $^{-1}$ л с $^{-1}$, а для ДМФТЦ $k_{\text{qO}_2} = 6,0 \times 10^8$ моль $^{-1}$ л с $^{-1}$. Взаимодействие с ДНК приводит к частичному экранированию молекул красителей, что затрудняет доступ молекул тушителя (O_2) к возбужденному Т-состоянию красителя, что выражается понижением константы скорости тушения.

Термическая диссоциация ДНК. Для подтверждения возможности образования комплексов интеркаляции проведены эксперименты по термической диссоциации ДНК в присутствии красителей. Кривые плавления ДНК позволяют точно определить точку плавления (T_m), т.е. температуру, при которой 50 % ДНК денатурировано. Эксперименты демонстрируют увеличение температур плавления T_m ДНК в образцах с красителями ДФТЦ и ДМФТЦ. Так, в случае ДФТЦ $T_m(\text{ДФТЦ}) = 79,1$ °С, что дает рост на 14,1 °С по сравнению с образцом ДНК, не содержащим красителя. Для ДМФТЦ увеличение T_m составляет 11,7 °С ($T_m(\text{ДМФТЦ}) = 76,7$ °С). Взаимодействие лигандов-интеркаляторов с ближайшими парами оснований ДНК приводит к заметному повышению T_m (за счет стабилизации биополимера).

ВЫВОДЫ

Показано, что в отличие от многих мезо-замещенных карбоцианинов, ДФТЦ и ДМФТЦ в растворах находятся в *транс*-форме (независимо от полярности растворителя). В качестве объяснения разницы изомерных конфигураций красителей предполагается различное влияние мезо-заместителей: для ДФТЦ и ДМФТЦ возможен поворот фенильного кольца заместителя, выводящий заместитель из плоскости молекул и уменьшающий его стерическое влияние на конфигурацию *транс*-изомеров.

Красители образуют с ДНК нековалентные комплексы, что сопровождается изменениями спектров поглощения и ростом флуоресценции красителей (комплекс *транс*-изомера). Анализ спектрально-

флуоресцентных свойств указывают на то, что ДФТЦ и ДМФТЦ способны образовывать с ДНК комплексы как в мономерной форме, так и в форме агрегатов. В комплексе с ДНК в отсутствие кислорода кинетики гибели триплетного состояния красителей являются двухэкспоненциальными, что может объясняться образованием нескольких типов комплекса красителей с ДНК. Эксперименты по термической денатурации ДНК свидетельствуют в пользу образования комплексов интеркаляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), проекты № 16-03-00735, № 16-03-00275.

Список литературы / References:

1. Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B., Cyanines during the 1990s: a review. *Chem. Rev.*, 2000, vol. 100, pp. 1973-2011.
2. Levitus M., Ranjit S., Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2011, vol. 44, pp. 123-151.
3. Khimenko V., Chibisov A.K., Gorner H., Effects of alkyl substituents in the polymethine chain on the photoprocesses in thiocarbocyanine dyes. *J. Phys. Chem. A*, 1997, vol. 101, pp. 7304-7310.
4. Armitage B.A. Cyanine Dye–DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation. *DNA Binders and Related Subjects, Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 55-76.
5. Бычкова А.В., Пронкин П.Г., Сорокина О.Н., и др. Исследование шитых по свободнорадикальному механизму белковых покрытий на магнитных наночастицах методом спектрально-флуоресцентных зондов. *Коллоидный журнал*, 2014, т. 76, с. 420-428. [Bychkova, A.V., Pronkin, P.G., Sorokina, O.N. et al. Study of protein coatings cross-linked via the free-radical mechanism on magnetic nanoparticles by the method of spectral and fluorescent probes. *Colloid Journal*, 2014, vol. 76 pp. 420-428. (In Russ.)]
6. Tatikolov A.S., Akimkin T.M., Pronkin P.G., Yarmoluk S.M. Enhancement of photoisomerization of polymethine dyes in complexes with biomacromolecules. *Chem. Phys. Lett.*, 2012, vol. 556, pp. 287-291
7. Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А. Фотохимические свойства мезо-замещенных тиокарбоцианиновых красителей в растворах и в комплексах с ДНК. *Химия высоких энергий*, 2006, т. 40, № 4, с. 295-302. [Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Sklyarenko V.I., Kuz'min V.A., Photochemical properties of meso-substituted thiocarbocyanine dyes in solutions and in complexes with DNA. *High Energy Chemistry*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 252-258. (In Russ.)]
8. Аниковский М.Ю., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Левин П.П., Скляренко В.И., Кузьмин В.А. Влияние ДНК на цис-транс равновесие и флуоресцентные свойства 3,3'-диэтил-9-тиометилтиокарбоцианиниодида в водном растворе, *Химия высоких энергий*, 2003, т. 37, № 6, с. 445-451. [Anikovskiy M.Yu., Tatikolov A.S., Pronkin, P.G., Levin, P.P., Sklyarenko, V.I., Kuzmin, V.A. DNA effect on cis-trans equilibrium and fluorescent properties of 3,3'-diethyl-9-thiomethylthiocarbocyanine iodide in aqueous solution. *High Energy Chemistry*, 2003, vol. 37, pp. 398-404. (In Russ.)]
9. Baguley B.C., Falkenhang E.-M. The interaction of ethidium with synthetic double-stranded polynucleotides at low ionic strength. *Nucl. Acids Res.*, 1978, vol. 5, pp. 161-171.
10. Ищенко А.А. *Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей*. Киев: Наукова думка, 1994, 231 с. [Ishchenko A.A. *Structure and Spectral-Fluorescent Properties of Polymethine Dyes*. Kiev: Naukova Dumka, 1994, 231 p. (In Russ.)]
11. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949. vol. 51, pp. 660-672.
12. Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Influence of the interaction with DNA on the spectral-fluorescent and photochemical properties of some meso-substituted polymethine dyes. *Spectrochim. Acta A*, 2018, vol. 202, pp. 269-275.
13. Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Tarabara U., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel asymmetric monomethine cyanine dyes derived from sulfobetaine benzothiazolium moiety as potential fluorescent dyes for non-covalent labeling of DNA. *Dyes and Pigments*, 2016, vol. 130, pp. 122-128.

**CATIONIC MESO-SUBSTITUTED THIACARBOCYANINE DYES
AS SPECTRAL-FLUORESCENT PROBES FOR DNA****Pronkin P.G., Shvedova L.A., Tatikolov A.S.**N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics,
Russian Academy of Sciences (IBCP PAS)*Kosygin str. 4, Moscow, 119334 Russia; e-mail: pronkinp@gmail.com*

Abstract. Spectral-fluorescent properties of new cationic thiacyanocyanine dyes – 3,3'-dimethyl-9-phenylthiacyanocyanine iodide (DPTC) and its analogue, 3,3'-diethyl-9-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)thiacyanocyanine iodide (DMPTC), have been studied. Despite the presence of bulky substituents in the *meso*-position of the polymethine chain, these dyes in solutions are in the forms of *trans*-isomers regardless of the solvent polarity. In a phosphate buffer solution, these dyes form noncovalent complexes with DNA. The interaction with DNA proceeds with the formation of dye complexes in both monomeric and aggregated forms and is accompanied by changes in the spectral-fluorescent properties of the dyes. The interaction of monomeric molecules of DPTC and DMPTC with DNA does not lead to a shift of the isomeric equilibrium toward the *cis*-isomer and proceeds mainly through the *trans*-isomer. The triplet state of dye molecules bound in a complex with DNA has been studied by flash photolysis. An increase in the melting temperature of DNA indicates the formation of intercalation complexes by the dyes.

Key words: *thiacyanocyanine dyes, DNA, noncovalent complex, spectral-fluorescent probes, flash photolysis, intercalation.*