ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА, 2023, том 42, № 9, с. 74–82

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 547.963.3

ИНДУЦИРОВАННАЯ ОПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОФЛАВИНА В КОМПЛЕКСАХ С ДНК

© 2023 г. А. И. Полетаев*

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия

**E-mail: aip45@mail.ru*

Поступила в редакцию 11.05.2022;
после доработки 17.06.2022;
принята в печать 20.06.2022

Профлавин (ПФ) – 2,6-диаминоакридин – является мутагеном и как один из красителей акридинового ряда способен образовывать комплексы с ДНК, что приводит как к появлению оптической активности в длинноволновой полосе поглощения красителя, так и к изменению оптической активности в УФ-области спектра, где наблюдается поглощение азотистых оснований ДНК. Экспериментальное исследование оптической активности в виде спектров кругового дихроизма (КД) показывает, что в видимой области спектра оптическая активность вызвана экситонным хромофор-хромофорным взаимодействием молекул красителя, образовавших комплекс с асимметричной спиральной молекулой ДНК. Появление дополнительного КД в УФ-области связано с экситонным взаимодействием коротковолновых оптических переходов молекул красителя с близкими по частотам УФ-переходами нуклеиновых оснований. Разложение спектров КД на компоненты позволяет выделить вклад от взаимодействия длинноволновых переходов красителя с коротковолновыми (УФ) переходами соседних хромофоров. В часности, обнаружен вклад от взаимодействия магнитного переходного момента хромофоров в высших колебательных состояниях с дипольными переходными моментами соседних хромофоров. Этот не описанный ранее эффект связан с нарушением плоскости симметрии ароматической системы красителя в высших колебательных состояниях, он отсутствует в области нулевой колебательной полосы. Построенная процедура разложения позволяет выделить из суммарных спектров КД вклады оптических взаимодействий, ранее описанных теоретически, что потенциально позволяет оценить геометрические параметры комплекса.

Ключевые слова: круговой дихроизм, индуцированная оптическая активность, мутагены, профлавин.

DOI: 10.31857/S0207401X23090091, **EDN:** AEJRYJ

ВВЕДЕНИЕ

Выбор объекта исследования в данной работе был в значительной мере продиктован тем, что акридиновый краситель профлавин (ПФ) – 2,6-диаминоакридин обладает легендарно известной биологической активностью (вызывает мутации со сдвигом рамки считывания [1]). Эта активность прямым образом связана с его способностью образовывать комплексы с двойной спиралью ДНК и послужила инструментом для доказательства триплетности генетического кода.

Изучение оптической активности биополимеров и их комплексов актуально по нескольким причинам: во-первых, хиральность биополимеров во многом определяет их структурирование и взаимодействия, в том числе с низкомолекулярными компонентами [2, 3]; во-вторых, хиральность биополимеров в значительной мере определяет характер упаковки генетического материала – хроматина, а также структуру белков и их специфических комплексов с низкомолекулярными агентами [4]. Исследование оптической активности белково-нуклеиновых комплексов [3] позволило получить сведения о структуре хроматина высших организмов, однако характер укладки генетического материала прокариот [5, 6] еще не полностью ясен. Исследование оптической активности нуклеопротеидных комплексов у бактерий может наряду с другими методами внести вклад в получение структурной информации [6]. Проявление оптической активности в модельных системах минимальной сложности может способствовать установлению относительной важности нескольких причин появления оптической активности, что необходимо для получения структурной информации. Химическая структура профлавина отличается простотой: она содержит три ароматических кольца и две аминогруппы (см. рис. 1) и минимальна по сравнению со структу-

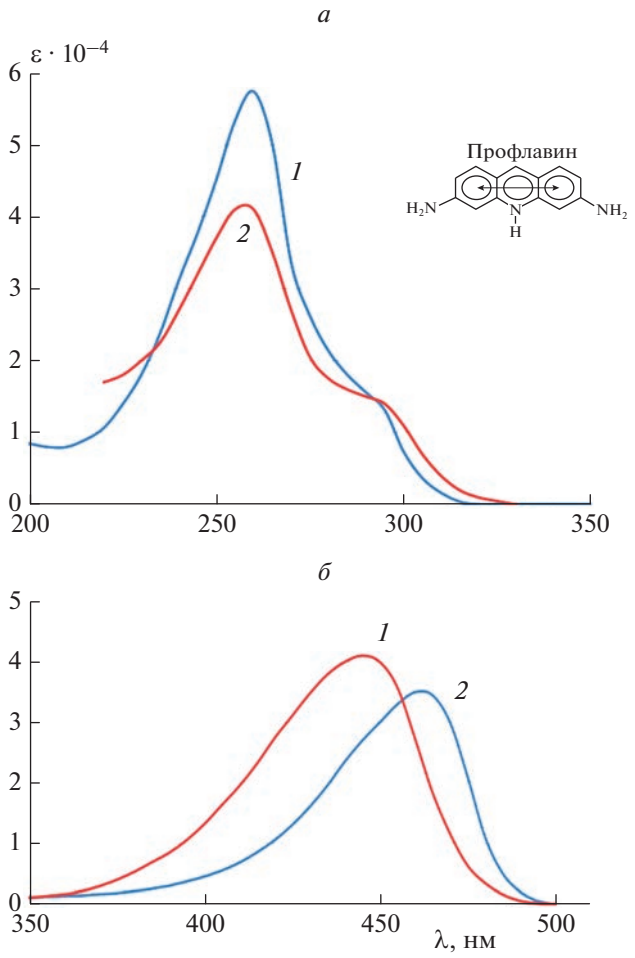

Рис. 1. Спектры поглощения ПФ в ультрафиолетовой (*а*) и видимой (*б*) областях спектра: кривые *1* – свободный краситель, кривые *2* – краситель в комплексе с ДНК. На вставке – структурная формула ПФ, стрелкой обозначено направление дипольного момента длинноволнового оптического перехода в молекуле ПФ.

рой других соединений, образующих биологически активные комплексы с ДНК.

Существуют две пространственные модели связывания ароматических красителей с ДНК: модель интеркалирования (прослаивания) молекул красителей между парами оснований ДНК [7, 8] и модель встраивания красителя в желоб двойной спирали ДНК [9]. Известны соединения, комплексы которых относятся как к первой, так и ко второй модели.

Спектры КД в высокой степени чувствительны к пространственной структуре как биополимеров [10], так и их комплексов [3]. Необходимо сразу отметить, что обратная задача – установление структуры биополимеров и их комплексов по спектрам КД – задача некорректная, поскольку одним и тем же параметрам спектров могут соответствовать вполне различные структуры. Данная работа представляет собой попытку разработки подхода для решения обратной задачи через разделение суммарного эффекта на отдельные компоненты и привлечение теоретического моделирования наблюдаемых эффектов КД [11, 12].

Молекулы профлавина симметричны (группа симметрии C_{2v}) и в свободном виде не обладают оптической активностью. Образуя комплексы с асимметричными полимерными молекулами-матрицами (ДНК или РНК) молекулы ПФ в области полос поглощения проявляют *индуцированную* оптическую активность в форме КД [3]. В соответствии с классическим рассмотрением величина оптической активности для оптического перехода $O \rightarrow \mathbf{a}$ из основного состояния O в возбужденное состояние **a** определяется – силой вращения [11] – параметром

$$R_{\mathbf{Oa}} = Im(\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{Oa}}\mathbf{m}_{\mathbf{Oa}}), \qquad (1)$$

мнимой частью скалярного произведения электрического дипольного момента перехода $\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{Oa}}$ и магнитного момента перехода $\mathbf{m}_{\mathbf{Oa}}$.

Теоретические расчеты оптической активности макромолекул и их комплексов основаны на допущении Кирквуда [12, 13], заключающемся в том, что молекулярную систему можно разбить на части, между которыми нет перекрывания волновых функций, электрического обмена и переноса заряда при возбуждении. В рамках этого приближения с использованием теории возмущений были получены общие выражения, которые достаточно наглядно описывают различные источники возникновения оптической активности макромолекул [14]:

$$R = R^{(1)} + R^{(2)} + R^{(3)} + R^{(4)}; \qquad (2)$$

здесь $R^{(1)}$ – вклад "собственной асимметрии" рассматриваемой группы (ее *хиральность*); $R^{(2)}$ – вклад от взаимодействий электрических моментов перехода с магнитными моментами перехода аналогичных групп, находящихся в асимметричном поле соседей; $R^{(3)}$ – вклад от взаимодействий электрических моментов перехода одного хромофора с магнитными моментами перехода другого хромофора; $R^{(4)}$ – корреляционное взаимодействие электрических дипольных моментов переходов различных хромофоров, расположенных поблизости друг от друга (существен для сильных полос поглощения).

Вклад $R^{(4)}$ – взаимодействие одинаковых электронных переходов в идентичных группах макромолекул рассматривается в рамках экситонного формализма [15, 16]. Такого рода анализ для полимеров был проведен в работах Тиноко с сотр. [17, 18], а для комплексов красителей с нуклеиновыми кислотами – в нашей работе [19]. В более поздней работе [20] индуцированная оптическая активность рассматривалась с использованием формализма, перенесенного из физики твердо-

го тела (экситон Френкеля), что, по-видимому, и определило малую точность теоретического описания. В цитированных работах не учитывались магнитные моменты переходов, а рассматривались исключительно электрические дипольные моменты переходов. Тем не менее спектроскопия кругового дихроизма как феноменологический метод оказалась весьма продуктивной при изучении конформационных переходов ДНК (B-форма → C-форма, B-форма → A-форма) [10], а позднее – и переходов B → Z [21].

В последние годы спектроскопия кругового дихроизма показала свою информативность при исследованиях наноразмерных структур, включающих ДНК и проявляющих плазмонный резонанс [22–24]. При этом необходимо отметить, что до сих пор остается без теоретической интерпретации происхождения кругового дихроизма комплексов ДНК с важными антибиотиками типа нетропсина и дистамицина [25]. По этой причине выяснение природы индуцированной оптической активности комплексов ДНК с различными низкомолекулярными соединениями не является завершенной задачей.

Целью настоящей работы было выявление условий, в которых проявляются компоненты $R^{(1)} - R^{(4)}$ индуцированной оптической активности, и оценка вклада магнитных моментов перехода в индуцированную активность красителя в комплексах с полинуклеотидными матрицами.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Измерения спектров КД проводили на дихрографе “Jobin-Yvon Mark III” (France). Спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре “Cary-118” (USA).

Спектры связанного красителя определяли с использованием специальных двухкамерных кювет “Hellma 238-QS” (Germany) с длиной оптического пути 2 × 4.36 мм. Концентрацию красителя определяли по спектрам свободного красителя, помещенного в одну из камер кюветы в канале образца. Во вторую камеру помещали раствор ДНК. Тот же раствор ДНК помещали в одну из камер кюветы, расположенной в канале сравнения спектрофотометра. Раствор ДНК брали с 50-кратным избытком. Спектры свободного красителя регистрировали перед смешиванием с ДНК. После смешивания красителя с ДНК в кювете образца регистрировали спектры поглощения комплексов ДНК с красителем. Такая дифференциальная схема позволяла получить спектры комплексов ПФ с ДНК как в видимой области спектра, так и в УФ-области – в области поглощения ДНК.

Профлавин производства фирмы “BDH” (England) использовали без дополнительной очистки; ДНК из тимуса теленка производства фирмы “Calbiochem” (USA) с содержанием белка <1% использовали после переосаждения с этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Образец двухцепочечной РНК (дцРНК) [16] также переосаждали с ЭДТА и растворяли в рабочем буфере, полагая молярный коэффициент экстинкции равным ε(260 нм) = 6600.

Молярный коэффициент экстинкции профлавина принимали равным ε(445 нм) = 41000, а для ДНК ε(260 нм) = 6600. Комплексы и ДНК растворяли в 0.01 M фосфатном буфере с pH = 6.1. Для исследования зависимости величины КД от ионной силы концентрацию NaCl устанавливали путем добавления солевого раствора с концентрацией 4.0 M.

Концентрационные зависимости амплитуды спектров КД получали при последовательном добавлении концентрированного раствора ПФ ([ПФ] = $4.9 \cdot 10^{-4}$ M) объемом по 20 мкл. Исходная концентрация ДНК соответствовала оптической плотности A_{260} = 0.61 опт. ед/см. Измерения спектров КД проводили в кювете с длиной оптического пути 2 см.

Зарегистрированные спектры КД переносились в таблицы программы Excel и обрабатывались средствами этого пакета.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 приведены спектры поглощения ПФ как в свободном состоянии (кривые *1*), так и в комплексе с ДНК (кривые *2*). Длинноволновая часть спектров была измерена при большом соотношении ДНК/ПФ ([P]/[ПФ] = 50, где [P] – молярная концентрация фосфатов ДНК). Отметим, что в УФ-области спектра (230–300 нм) наблюдается уменьшение поглощения ПФ при образовании комплекса с ДНК. В видимой области спектра (350–500 нм) связывание с ДНК приводит к сдвигу спектров в длинноволновую сторону.

На рис. 2 приведены спектры КД комплексов тимусной ДНК с ПФ как в УФ-области (220–310 нм) – рис. 1*а*, так и в области длинноволновой полосы поглощения ПФ (400–500 нм) – рис. 1*б*. Серии спектров получали при добавлении равных объемов концентрированного раствора ПФ как описано выше (см. разд. “Методика эксперимента”). В обеих сериях спектров наблюдаются изобестические точки: при 258 нм в УФ- и при 451 нм в видимой областях. По мере увеличения концентрации ПФ в комплексе наблюдается рост амплитуд как положительной, так и отрицательной по знаку полос в спектре КД УФ-области. Такого типа эффект (две полосы разных знаков, разнесенные по длинам волн, и примерно одинаковой площади) называется *консервативным*. В длинноволновой части спектров КД амплитуда положительной полосы с максимумом

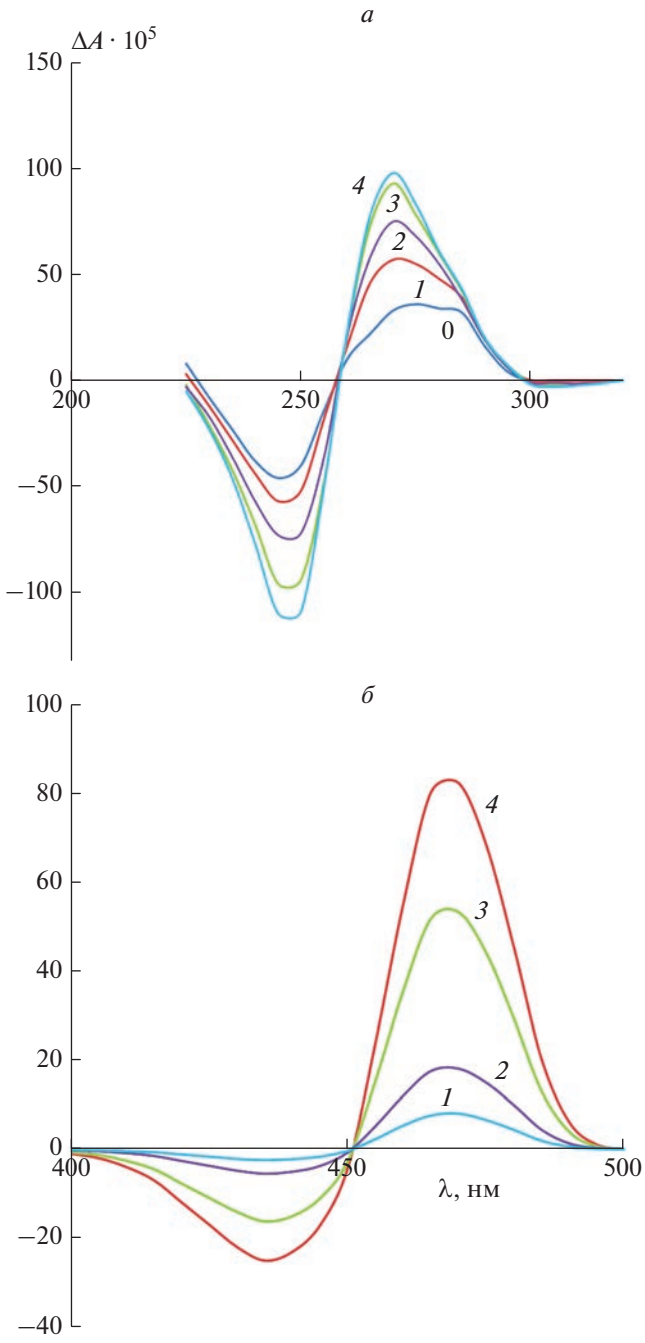

Рис. 2. Спектры КД комплексов ПФ с ДНК: *а* – УФ-область, *б* – видимая область; 0 – свободная ДНК. Концентрация фосфатов ДНК: [P] – $9.2 \cdot 10^{-5}$ М. Концентрация [ПФ]: *1* – $4.9 \cdot 10^{-6}$ М, *2* – $8.16 \cdot 10^{-6}$ М, *3* – $1.3 \cdot 10^{-5}$ М, *4* – $1.63 \cdot 10^{-5}$ М. По ординате отложена величина кругового дихроизма: $\Delta A = A_L - A_R$, где индексы "*L*" и "*R*" – лево- и правополяризованный свет.

при $\lambda = 468$ нм превосходит амплитуду отрицательной полосы, имеющей максимум в области $\lambda = 435$ нм, хотя качественно в спектрах КД просматривается вклад консервативного эффекта.

На рис. 2 приведены спектры выборочно, а детальные зависимости амплитуд КД от концентрации добавленного ПФ приведены на рис. 3. Даже при беглом взгляде на приведенные зависимости заметно, что прирост амплитуды КД, ΔA, в УФ-области (кривая *1*) линейно зависит от концентрации добавленного красителя, в то время как в длинноволновой части спектра прирост амплитуды при 468 нм (кривая *2*) отличен от линейного. Это различие будет обсуждаться далее. Также отметим, что уменьшение ΔA в области больших относительных концентраций красителя ([ПФ]/[P] > 0.09) связано с насыщением мест связывания ПФ на ДНК.

При регистрации спектров КД в длинноволновой области (400–500 нм) был отмечен небольшой по амплитуде сигнал при малых относительных концентрациях ПФ ([ПФ]/[P] ~ 0.01). В отдельной серии экспериментов были использованы высокие концентрации красителя – [ПФ] ~ 10^{-5} М ($A_{460\ нм}$ ~ 0.4) и ДНК – [P] > 10^{-3} М при сохранении соотношения [ПФ]/[P] ~ 0.01. На рис. 4*а* приведены спектры КД комплексов ДНК–ПФ, полученные при разных ионных силах – концентрациях [Na^+]. На приведенных графиках амплитуда пересчитана в молярные единицы – $\Delta\varepsilon$. Спектр *1* соответствует раствору с [Na^+] = 10^{-2} М, а спектр *2* значительно более высокой концентрации соли – 1 М. Если при малой ионной силе амплитуда спектра КД лишь незначительно превышает уровень шумов измерения (спектр *1*), то при высокой концентрации соли натрия (спектр *2*) спектр КД измеряется с точностью, достаточной, чтобы констатировать его подобие по форме со спектром поглощения связанного с ДНК профлавина (рис. 1, спектр *2*). Была исследована зависимость величины амплитуды КД от концентрации ионов Na^+, точнее от ее логарифма — p[Na^+] (рис. 4*б*). Нетрудно заметить, что изменение амплитуды КД происходит в области концентраций ионов натрия от 0.1 до 1 М. Этот диапазон соответствует конформационному переходу молекул ДНК из В-формы в С-форму [10].

Установление факта зависимости индуцированной оптической активности ПФ от конформации полимера-матрицы побудило исследовать спектры КД комплексов ПФ с рибополимером, который имеет конформацию А-формы в области спаривания оснований [10]. На рис. 5*а* представлен спектр КД (спектр *1*) комплекса ПФ с дцРНК которая, как известно, состоит из двуспиральных участков с конформацией типа А-формы [26]. Спектр КД комплекса дцРНК–ПФ в длинноволновой области по форме отличен от спектров КД комплексов ДНК–ПФ и представлен широкой полосой, имеющей положительную амплитуду. Существенного знакопеременного консервативного вклада в спектр КД не наблюдается. Это различие в характере спектров КД комплексов ДНК–

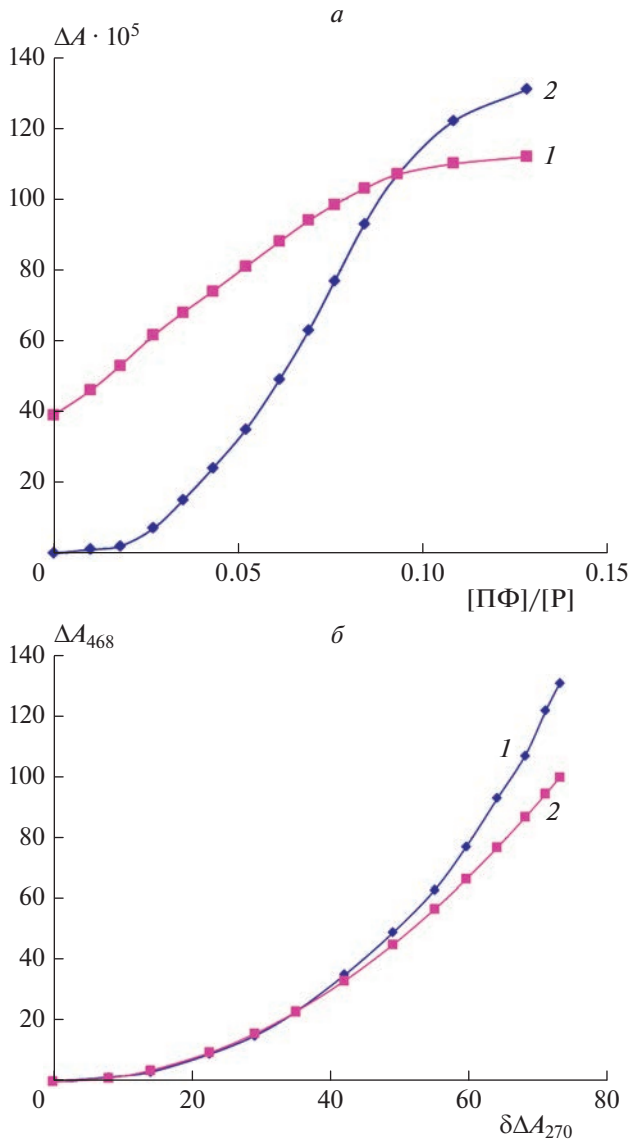

Рис. 3. *а* – Зависимость изменения амплитуды КД от относительной концентрации ПФ в комплексе ([ПФ]/[Р]) при 270 нм (кривая *1*) и 468 нм (кривая *2*); *б* – зависимость величины амплитуды КД при 468 нм от прироста КД в УФ-области при 270 нм (кривая *1*); кривая *2* – квадратичная аппроксимация начального участка кривой *1*.

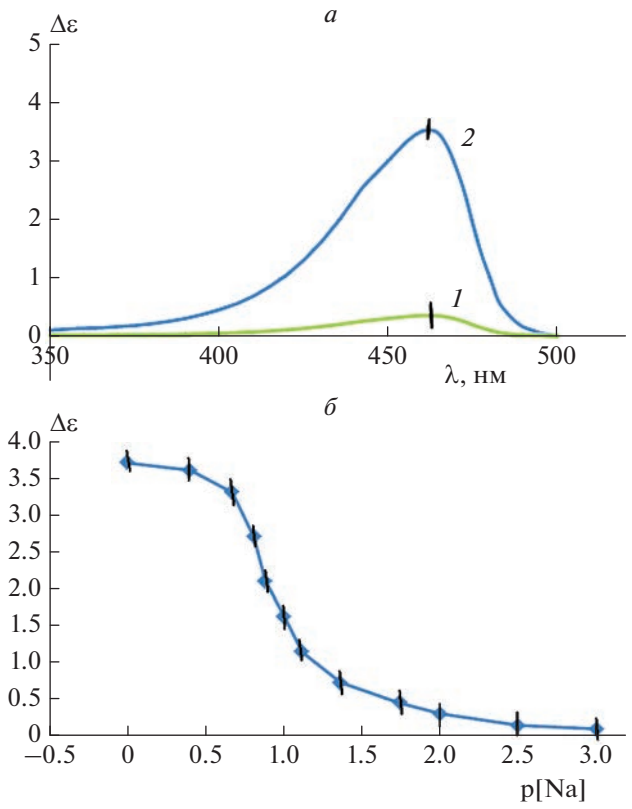

Рис. 4. Зависимость амплитуды спектров КД комплекса ДНК–ПФ ([ПФ]/[Р] ~ 0.012) от ионной силы буфера: *а* – спектр *1* получен при концентрации $[Na^+] = 10^{-2}$ М, спектр *2* – при концентрации $[Na^+] = 1.0$ М; *б* – детальная зависимость амплитуды КД при 460 нм от логарифма концентрации Na^+ – $p[Na^+]$. По ординате приведены молярные величины КД, на спектрах и кривой обозначены величины ошибки измерения.

ПФ и РНК–ПФ свидетельствует о принципиальном влиянии конформации полимера-матрицы на характер индуцированной оптической активности красителя, связанного с матрицей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенные на рис. 1*а* спектры показывают, что при образовании комплекса с ДНК спектр поглощения ПФ в УФ-области проявляет *гипохромный* эффект (уменьшение величины поглощения). Естественно интерпретировать этот факт как следствие контакта ароматических колец красителя с плоскостями оснований ДНК и взаимодействия электронных переходов красителя с переходами азотистых оснований ДНК. Аналогичное явление наблюдается и у других красителей, способных образовывать комплексы с ДНК и имеющих выраженную ароматическую систему в основе своей структуры [26]. Образование комплекса с ДНК проявляется и в длинноволновой части спектров ПФ (рис. 1) сдвигом максимума спектра в область более длинных волн (*батохромный* сдвиг), что есть следствие изменения локального окружения молекул красителя при переходе его из водного раствора в комплекс.

Приведенные на рис. 2 серии спектров КД в УФ- (рис. 2*а*) и видимой областях (рис. 2*б*), полученные путем последовательного увеличения концентрации ПФ, показывают различный характер зависимости амплитуды КД от концентрации ПФ. В УФ-области наблюдается близкий к ли-

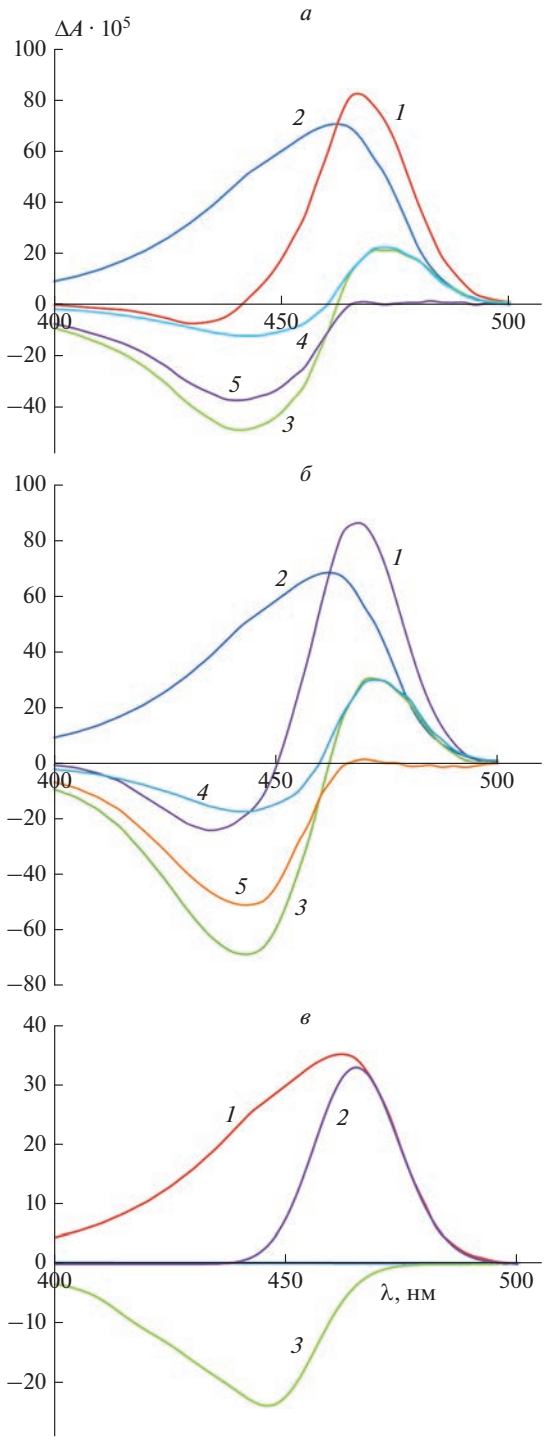

Рис. 5. Разложение на компоненты спектров КД комплексов дцРНК–ПФ ([ПФ]/[Р] = 0.085) – *а* и ДНК–ПФ – *б* (спектр *4* на рис. 2*б*): *1* – экспериментально измеренный спектр КД; *2* – неконсервативный вклад в спектр КД; *3* – разность спектра *1* и неконсервативного вклада (спектр *2*); *4* – вклад расщепленной консервативной компоненты в спектр *3*; *5* – разностный спектр *3* за вычетом консервативной компоненты *4*. На рис. *5в* приведен нормированный спектр поглощения ПФ в комплексе с ДНК (кривая *1*); кривая *2* – полоса нулевой вибронной компоненты спектра *1*, полученная аппроксимацией в шкале частот; кривая *3* – разность спектров *1* и *2*, подобная по форме кривым *5* рис. 5*а* и 5*б*.

нейному рост амплитуды КД с увеличением относительной концентрации ПФ. Наблюдается максимум при 270 нм в положительной части и при 248 нм – в отрицательной. В серии спектров наблюдается изобестическая точка при 259 нм, что свидетельствует о наличии только одного типа спектрально различимого комплекса. В длинноволновой области концентрационная зависимость далека от линейности, но в серии спектров наблюдается изобестическая точка при 401 нм, что свидетельствует о наличии только одной спектроскопической формы комплекса.

На рис. 3*а* приведены подробные концентрационные зависимости амплитуд индуцированного КД в положительной полосе при 270 нм (кривая *1*) и в длинноволновой части спектра (468 нм). Линейный рост амплитуды в УФ-области свидетельствует о том, что данный эффект индуцируется за счет взаимодействия индивидуальных молекул красителя с асимметричной матрицей (ДНК). Естественно называть эффект такого типа *мономерным*. Природа его в данном проявлении связана с взаимодействием УФ-переходов в хромофорах красителя (см. рис. 1*а*) с различными УФ-переходами азотистых оснований ДНК [27]. Причина появления этого консервативного эффекта, не зависящего от относительной концентрации красителя на линейной молекуле ДНК (величина [ПФ]/[Р]), описывается, как уже отмечалось во Введении (вклад $R^{(4)}$), в рамках экситонного формализма [16]. Такого рода теоретическое описание для биополимеров было проведено в работах Тиноко с сотр. [17, 18], а для комплексов красителей с нуклеиновыми кислотами – в работе [19].

Поскольку амплитуда КД в УФ-части спектра линейно зависит от концентрации связанного с ДНК красителя, было естественным построить зависимость амплитуды длинноволнoй полосы КД (468 нм) от величины амплитуды КД при 270 нм. Эта зависимость приведена на рис. 3*б*. По оси абсцисс отложен прирост амплитуды при 270 нм, а по оси ординат – амплитуда КД при 468 нм. Построенное отложение позволяет учесть эффект насыщения при больших величинах относительной концентрации красителя – [ПФ]/[Р]. Полученная кривая *1* по форме близка к параболе. Кривая *2* на рис. 3*б* представляет собой параболическую аппроксимацию начального участка зависимости. На начальном участке, до величины [ПФ]/[Р] ~ 0.05, рост хорошо соответствует квадратичной зависимости, что свидетельствует о *димерном* характере возникающего индуцированного эффекта КД [20]. Отклонение кривой роста амплитуды КД ΔA_{468} при величинах [ПФ]/[Р] > 0.05 от параболической зависимости может быть вызвано двумя причинами. Во-первых, появлением не только “димеров” молекул красителя на соседних местах связывания, но и “тримеров” и других, более

высоких по числу молекул красителя, сочетаний. Во-вторых, отклонение ΔA_{468} от параболы может быть связано с изменением пространственной структуры самой ДНК, вызванным связыванием красителя при больших величинах [ПФ]/[Р].

Влияние конформации ДНК на величину индуцированного мономерного КД продемонстрировано в экспериментах, результаты которых приведенны на рис. 4. Если при низкой ионной силе буферного раствора имеет конформацию В-формы, индуцированный мономерный эффект КД по величине мал и лишь немного превышает по амплитуде точность его регистрации (рис. 4*а*), то повышение ионной силы буфера вызывает его существенный рост. Рост индуцированной КД идет по концентрации [Na] симбатно переходу ДНК в С-конформацию (рис. 4*б*) [10]. Следует отметить, что по форме спектра КД этот индуцированный эффект (рис. 4*а*, кривая *2*) в высокой степени подобен спектру поглощения связанного ПФ (рис. 1*б*, спектр *2*). По своей природе эффект этого типа естественно интерпретировать как $R^{(2)}$ – вклад от взаимодействий электрических моментов перехода хромофора с его магнитным моментом перехода, находящимся в асимметричном поле соседей (формула (2)). В данном случае переход ДНК из В-конформации [28] в С-конформацию [29] происходит с определенными изменениями геометрических параметров двойной спирали.

Существенная зависимость характера индуцированного КД от конформации полинуклеотидной матрицы хорошо иллюстрируется результатами, приведенными на рис. 5*а*. Длинноволновая часть спектра КД комплекса дцРНК–ПФ (рис. 5*а*, кривая *1*) существенно отличается по своей форме от спектра ДНК–ПФ (рис. 5*б*, кривая *1*). Спектр комплекса дцРНК–ПФ резко неконсервативен, т.е. представлен практически только полосой положительного знака и лишь малым эффектом КД в области меньших длин волн (410–440 нм). Поскольку основная часть эффекта КД в видимой области возникает в результате парных взаимодействий хромофоров красителя, располагающихся на ДНК на соседних местах связывания (рис. 3), он определяется вкладом $R^{(4)}$ в формуле (2). Для детального анализа различий в форме спектров КД комплексов ДНК–ПФ и дцРНК–ПФ было проведено разложение обоих спектров на консервативную и неконсервативную компоненты в соответствием с результатами теоретического описания этих эффектов, приведенного в работе [19]. Сразу отметим, что в упоминаемой работе рассматривались только взаимодействия дипольных моментов переходов соседних хромофоров на спиральной полимерной матрице.

Разложение спектров КД на составляющие компоненты

Для разложения из серии спектров КД комплекса ДНК–ПФ (рис. 5*б*) был выбран спектр, близкий по суммарной амплитуде к спектру КД комплекса дцРНК-ПФ (рис. 5*а*). В соответствии с результатами нашей работы (см. рисунок в [19]) неконсервативную компоненту спектра полагали совпадающей по форме со спектром поглощения – кривые *2* на рис. 5*а* и *б*. Спектры КД за вычетом неконсервативного вклада представлены на рис. 5 кривыми *3*. Необходимо напомнить, что неконсервативный вклад в спектр КД возникает в результате взаимодействия длинноволновых и коротковолновых переходов в “димере” соседних хромофоров [3, 19]. Этот вклад пропорционален квадрату относительной концентрации [ПФ]/[Р] [3, 19].

Консервативный вклад в спектры КД от взаимодействия хромофоров ПФ в “димерах” полагали по форме соответствующим первой производной спектра поглощения [19]. Производная спектра поглощения равна нулю в максимуме спектра. Именно в этой точке спектра КД определяется амплитуда для нормирования величины неконсервативного вклада – амплитуда кривых *2* на рис. 5.

Результат вычитания (кривые *3* на рис. 5) не является консервативным: амплитуды положительных длинноволновых частей по площади существенно меньше, чем амплитуды и площади коротковолновых отрицательных компонент спектров. Этот факт был отмечен достаточно давно [3], но не нашел естественного объяснения. Вклады, соответствующие производной спектра поглощения связанного ПФ (рис. 5, кривые *4*), нормировали по амплитуде длинноволновой части (465–490 нм) остаточных вкладов (рис. 5, кривые *3*). Вычитание консервативных вкладов типа *4* дает остаточные вклады типа *5* (рис. 5*а* и *б*). Для спектров как комплекса ДНК–ПФ, так и дцРНК–ПФ эти “остаточные” спектры имеют отрицательную амплитуду и простираются в области 400–465 нм. Для комплексов ПФ с обоими типами полинуклеотидов вклады типа *5* весьма схожи по форме и имеют широкий отрицательный максимум при 440–450 нм. В области спектра 465–500 нм эти эффекты близки к нулю (с точностью до ошибки разложения). Естественно встает вопрос о природе этих вкладов (кривые *5* на рис. 5*а* и *б*).

Принципиально важно отметить, что близкие к нулевым амплитуды вкладов типа *5* располагаются в области колебательного подуровня $0 \rightarrow 0$ в спектре ПФ [30]. Была проведена аппроксимация длинноволновой части спектра поглощения связанного с ДНК профлавина отдельной колебательной полосой гауссовой формы. Аппроксимацию проводили в частотной шкале:

$$A(\nu) = A_0 \exp\left\{-(\nu - \nu_0)^2/\Delta\nu^2\right\}, \qquad (3)$$

со следующими параметрами полосы: A_0 – амплитуда в максимуме полосы, ν_0 – частота в максимуме, $\Delta\nu$ – ширина полосы. Для разложения, приведенного на рис. 5*в*, $\nu_0 = 21500$ см$^{-1}$, а $\Delta\nu = 600$ см$^{-1}$. Эти параметры соответствуют кривой *2* рис. 5*в*. Кривая *3* на рис. 5*в* представляет собой разность спектра поглощения (кривая *1*) и нулевой колебательной полосы (кривая *2*). Сравнение кривой *3* рис. 5*в* с кривыми *5* рис. 5*а* и *б* демонстрирует достаточно высокое совпадение их по форме. Для выяснения природы этого совпадения обратимся к данным спектроскопии красителей.

Влияние колебательной структуры спектров красителей на форму спектров КД теоретически было рассмотрено в работах Франка-Каменецкого и Лукашина [31, 32]. Теоретическое рассмотрение учитывало три типа вкладов: 1) от асимметризации движения электронов при неподвижных ядрах атомов в молекуле; 2) от смещения равновесных положений атомов вдоль асимметричных нормальных координат в основном электронном состоянии; 3) от различной асимметризации молекул в основном и возбужденном состояниях. Вклады первых двух типов приводят к спектрам КД, подобным по форме спектрам поглощения. В работе [33] анализировалось влияние колебательной структуры оптических переходов на спектры поглощения и флуоресценции мономеров и ковалентно связанных димеров хромофоров красителей. Исследование спектров КД димерных красителей показывает [34], что в коротковолновой области расщепленная компонента спектров имеет неконсервативный характер и качественно подобна кривым *3* рис. 5. Этот факт остался без внимания и объяснения, но вполне соответствует приведенному выше анализу.

Имеющиеся теоретические описания [31, 32] не помогают объяснить природу остаточных вкладов типа *5* от взаимодействий хромофоров красителя, располагающихся на ДНК на соседних местах связывания. Для объяснения этого эффекта можно предположить механизм другого типа.

Логично было бы связать эти компоненты с вкладом $R^{(3)}$ в формуле (2), точнее, с нарушением плоской симметрии хромофоров красителя, находящихся в высших колебательных (фононных) состояниях: $0 \rightarrow 1$, $0 \rightarrow 2$ и т.д. Это нарушение симметрии должно вызывать изменение величины и ориентации магнитного момента перехода для этих колебательных подуровней. В результате в парах соседних хромофоров возникает дополнительная оптическая активность от вклада типа $R^{(3)}$ (формула (2)) – взаимодействий электрических моментов перехода одного хромофора с магнитными моментами перехода другого хромофора, находящегося на высшем колебательном подуровне. Уместно отметить, что ширина полосы колебательного безфононного подуровня $0 \rightarrow 0$, не участвующего в формировании этого вклада, как раз соответствует зоне нулевой интенсивности кривых *5* рис. 5 – 465–490 нм. Ширина колебательного подуровня для акридиновых хромофоров в шкале частот имеет величину порядка 800–1000 см$^{-1}$ [35], что как раз охватывает зону нулевой интенсивности кривых *5* рис. 5. Колебания с указанной частотой должны проявляться в ИК-спектрах хромофоров. Действительно, ИК-полосы с частотами около 1000 см$^{-1}$ характерны для колебаний боковых заместителей ароматических систем [36]. Колебания боковых групп должны нарушать симметрию плоских ароматических молекул и приводить к появлению магнитной и квадрупольной компонент переходного момента и, как следствие, к появлению дополнительного вклада $R^{(3)}$ (рис. 5, кривые *5*) в суммарный эффект КД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индуцированная оптическая активность молекул ПФ в комплексах с асимметричными полимерами (ДНК и дцРНК) возникает в результате различных взаимодействий: 1) взаимодействий электрических моментов оптических переходов с магнитными моментами перехода аналогичных групп, находящихся в асимметричном поле полинуклеотидов; 2) взаимодействия электрических дипольных моментов переходов различных хромофоров, расположенных поблизости друг от друга; 3) взаимодействий электрических моментов перехода одного хромофора с магнитными моментами перехода соседних хромофоров. Вклады второго и третьего типов зависят от измеряемых спектральных характеристик связанных хромофоров и геометрических параметров комплексов, что позволяет провести параметризацию теоретических выражений в явном виде.

В следующих публикациях планируется продемонстрировать результаты количественного анализа этих взаимодействий, позволяющего оценить геометрические характеристики комплексов некоторых биологически активных соединений с ДНК. Описанная выше процедура разложения спектров КД является основой этого анализа.

Логично сделать вывод, что комплексы профлавина с ДНК и дцРНК являются достаточно простой (если не минимальной) моделью, в которой проявляются различные типы эффектов индуцированной оптической активности.

Работа выполнена в рамках госзадания (тема № 122 040 400 089-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Crick F.H., Barnett L., Brenner S. et al.* // Nature. 1961. V. 192. P. 1227; https://doi.org/10.1038/1921227a0

2. *Стовбун С.В., Занин А.М., Скоблин А.А. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 5. С. 54; https://doi.org/10.1134/S0207401X19040113
3. *Полетаев А.И.* // Итоги науки и техники. Сер. “Молекулярная биология”. Т. 8. Ч. II. М.: ВИНИТИ, 1976. С. 180.
4. *Пронкин П.Г, Татиколов А.С.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 3; https://doi.org/10.31857/S0207401X2102014X
5. *Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Коваленко В.В. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 8. № 10. С. 48; https://doi.org/10.1134/S0207401X19100091
6. *Крупянский Ю.Ф.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 3. С. 60; https://doi.org/10.31857/S0207401X21030079
7. *Lerman L.S.* // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 18.
8. *Lerman L.S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1963. V. 49. P. 94.
9. *Гурский Г.В.* // Биофизика. 1966. V. 11. P. 737.
10. *Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Scholkina A.K. et al.* // Biopolymers. 1973. V. 12. P. 89; https://doi.org/10.1002/bip.1973.360120109
11. *Rosenfeld L.* // Z. Physik. 1928. V. 52. P. 161.
12. *Снатске Г.* // Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии. М.: Мир, 1970. С. 45.
13. *Kirkwood J.G.* // J. Chem. Phys. 1937. V. 5. P. 479; https://doi.org/10.1063/1.1750060
14. *Tinoco I.* // Adv. Chem. Phys. 1962. V. 4. P. 113.
15. *Moffitt W.* // J. Chem. Phys. 1956. V. 25. P. 467.
16. *Woody R.W., Tinoco I.* // Ibid. 1967. V. 46. P. 4927; https://doi.org/10.1063/1.1840658
17. *Tinoco I.* // Rad. Res. 1963. V. 20. P. 133.
18. *Johnson W.C., Tinoco I.* // Biopolymers. 1969. V. 7. P. 727; https://doi.org/10.1002/bip.1969.360080603
19. *Макаров В.Л., Полетаев А.И., Волькенштейн М.В.* // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 238.
20. *Kamiya M.* // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 562. P. 70; https://doi.org/10.1016/0005-2787(79)90127-8
21. *Kypr J., Kejnovska I., Renciuk D. et al.* // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 1713; https://doi.org/10.1093/nar/gkp026
22. *Schreibe R., Luong N., Fan Z. et al.* // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 2948; https://doi.org/10.1038/ncomms3948
23. *Wang X., Tang Z.* // Small. 2017. V. 13. P. 1601115; https://doi.org/10.1002/smll.201601115
24. *Shin S.W., Yuk J.S., Chun S.H. et al.* // Nano Converg. 2020. V. 7. P. 2; https://doi.org/10.1186/s40580-019-0211-4
25. *Zimmer Ch., Wähnert U.* // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1986. V. 47. P. 31; https://doi.org/10.1016/0079-6107(86)90005-2
26. *Макаров В.Л., Полетаев А.И., Свешников П.Г. и др.* // Молекуляр. биология. 1979. Т. 13. С. 450.
27. *Moore D.S., Wagner N.T.* // Biopolymers. 1973. V. 12. № 1. P. 201; https://doi.org/10.1002/BIP.1974.360130512
28. *Langridge R., Marvin D.F., Seeds W.E. et al.* // J. Mol. Biol. 1960. V. 2. P. 38; https://doi.org/10.1016/S0022-2836(60)80005-8
29. *Fuller W., Wilkins M.H.F., Wilson Y.R. et al.* // Ibid. 1965. V. 12. P. 60; https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80282-0
30. *Теренин А.Н.* Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений Л.: Наука, 1967.
31. *Франк-Каменецкий М.Д., Лукашин А.В.* // Оптика и спектроскопия. 1971. Т. 30. С. 481.
32. *Иванов А.А., Пурецкий А.А., Лукашин А.В. и др.* // Письма в ЖЭТФ. 1971. Т. 14. С. 419.
33. *Иванов А.А., Пурецкий А.А., Лукашин А.В. и др.* // Оптика и спектроскопия. 1972. Т. 32. С. 481.
34. *Пермогоров В.И.* // Молекуляр. биология. 1973. Т. 7. С. 20.
35. *Dalgleish D.G., Fujita H., Peacocke A.R.* // Biopolimers. 1969. V. 8. P. 623; https://doi.org/10.1002/BIP.1969.360080506
36. *Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К.* Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных. М.: Мир, 2006.