

УДК 577.3

АНАЛИЗ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ

© 2025 г. Ю.Д. Нечипуренко^{*,**,#}, Е.А. Новикова^{*}, Н.М. Смирнов^{*}, К.К. Хорунжева^{***},
Б.В. Папонов^{****}, А.Ф. Арутюнян^{*}, Д.Н. Калюжный^{*,##}

^{*}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

^{**}Научно-исследовательский институт развития мозга и высших достижений Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

^{***}Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Институтский пер., 9, Долгопрудный, Московская обл., 141701, Россия

^{****}Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Минздрава России, ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

[#]E-mail: nech99@mail.ru

^{##}E-mail: uzhny@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2024 г.

После доработки 10.12.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2025 г.

Определение параметров взаимодействия низкомолекулярных соединений с ДНК затруднено в случаях, когда соединения не обладают заметной флуоресценцией или их спектральные изменения сложно интерпретировать. Для решения этой задачи предложен подход, включающий использование известных флуоресцентных красителей, конкурентно связывающихся на ДНК. В рамках этого подхода используется модель, описывающая конкурентное связывание двух протяженных лигандов на линейной матрице ДНК. Эта модель позволяет провести аппроксимацию экспериментальных данных и определить параметры связывания, соответствующие двум нефлуоресцирующим типам лигандов. Первый тип лигандов демонстрирует интеркаляционное связывание с ДНК и конкурирует с этидий бромидом, а второй связывается по узкой бороздке и конкурирует с красителем Hoechst 33258.

Ключевые слова: конкурентное связывание лигандов с ДНК, термодинамические модели, изотермы адсорбции, уравнения связывания, анализ изотерм адсорбции, Hoechst 33258, этидий бромид.

DOI: 10.31857/S0006302925030026, EDN: KSFNYU

ДНК является одной из ключевых мишеней для действия перспективных противоопухолевых и антибактериальных агентов. Взаимодействие низкомолекулярных соединений с ДНК способно изменять ее структуру и функциональные свойства, что лежит в основе их терапевтического действия. Определение параметров такого взаимодействия является необходимым шагом для выяснения механизма действия этих соединений.

Для описания процесса взаимодействия соединений с ДНК традиционно используются модельные физико-химические эксперименты в растворе. Многие противоопухолевые соединения, красители и другие лиганды при связывании с нуклеиновыми кислотами изменяют свои оптические свойства, что позволяет получать изотермы адсорбции и определять такие параметры, как размер участка, который занимает лиганд на

ДНК, и константа связывания [1]. Эти данные служат основой для анализа взаимодействия лиганда с ДНК и построения моделей комплексов «лиганд-нуклеиновая кислота» (см., например, работу [2]). Однако для лигандов, не обладающих выраженными оптическими свойствами, анализ взаимодействия с ДНК затруднен.

Одним из эффективных подходов в таких случаях является метод конкурентного замещения [3]. Лиганды с выраженными оптическими свойствами могут использоваться в качестве сенсоров, конкурирующих с «невидимыми» соединениями за связывающие участки на олигонуклеотидах. Если оба лиганда взаимодействуют с одними и теми же участками, анализ кривых вытеснения позволяет определить параметры связывания для оптически невидимого соединения [4]. Однако анализ кривых вытеснения затруднен, если свя-

зывание происходит не с короткими олигонуклеотидами, а с длинными молекулами ДНК.

«Стандартным» красителем, интеркаляционный тип связывания которого с ДНК детально изучен, является этидий бромид (см., например, работы [5, 6]). Так как краситель не демонстрирует избирательности связывания, можно использовать для описания его взаимодействия с ДНК представления, развитые ранее для описания связывания лигандов с гомополимерами. В отличие от этидий бромида, краситель Hoechst 33258 демонстрирует высокую специфичность к АТ-богатым участкам ДНК, связываясь с малой бороздкой и обладая значительной флуоресценцией [7, 8]. Эти свойства делают краситель Hoechst 33258 модельным соединением для изучения взаимодействий, характерных для лигандов малой бороздки ДНК.

В настоящей работе развит подход, позволяющий описать конкурентное связывание двух протяженных лигандов на гомополимере ДНК и анализировать экспериментальные данные. Мы продемонстрировали возможности этого подхода на примерах анализа экспериментальных данных для двух систем, включающих красители и конкурирующие с ними лиганды.

Хорошо известны уравнения, которые описывают связывание с ДНК лигандов одного типа. Впервые связывание протяженных лигандов с полимерами с точки зрения статистической термодинамики было описано в работах [9, 10]. Уравнения адсорбции, описывающие связывание в этом случае, получили распространение после выхода в свет работы [11]. Эти уравнения были представлены в удобной форме авторами работы [12], где впервые получены уравнения, описывающие кооперативное связывание лигандов (см. также работу [13]). Такие уравнения известны по именам МакГи и фон Хиппеля, показавших наглядно их вывод в известной работе [14]. Уравнения для описания конкурентного связывания на гомополимере двух лигандов тоже получены достаточно давно [15–18], однако до последнего времени редко применялись в исследованиях [19, 20]. Заметим, что уравнения похожи на соотношения, описывающие взаимодействие с гомополимером лиганда, который образует два типа комплекса [21]. Такое сходство позволяет применять аналогичные математические подходы для описания процессов связывания, обеспечивая возможность более детального анализа особенностей взаимодействия в разных системах.

В данной работе мы показываем примеры применения теоретической модели для анализа конкурентного связывания двух серий новых лигандов, не обладающих ярко выраженными оптическими свойствами. Мы провели эксперименты, в

которых эти лиганды конкурируют за связывающие участки на ДНК с известными красителями — этидием бромидом и Hoechst 33258. Применение нашего подхода позволило определить константы связывания и размеры мест на ДНК, которые занимают эти лиганды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ДНК спермы лосося, препарат «Деринат», красители этидий бромид (EtBr) и Hoechst 33258, а также поли(dAdT), приобретенные в компании Sigma (США). Растворы готовили в буфере, близком к физиологическим условиям: 150 мМ KCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.5. Тестируемые соединения были приготовлены в стоковой концентрации 1 мМ растворением в воде непосредственно перед проведением эксперимента.

Измерение спектров флуоресценции. Спектры флуоресценции регистрировали с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent, США) в термостатируемой кюветной ячейке при температуре 25°C. Возбуждение для EtBr проводили при длине волны 540 нм, а для Hoechst 33258 — при 360 нм. Для анализа флуоресценции измеряли эмиссию на длине волны 600 нм для EtBr и 480 нм для Hoechst 33258.

Растворы красителей и ДНК титровали нефлуоресцирующими соединениями. Измерения проводились при постоянной концентрации красителя и ДНК, при этом изменения интенсивности флуоресценции регистрировали для оценки конкурентного связывания.

Модель связывания. Рассмотрим раствор, в котором при постоянной температуре и постоянном давлении в равновесии находятся молекулы ДНК, краситель и исследуемый лиганд. Пусть краситель связывается с ДНК неизбирательно и закрывает (блокирует) L_0 пар оснований, которые мы будем называть связывающим местом. Обозначим константу связывания для красителя с этим местом K_0 . Пусть L_1 и K_1 обозначают соответственно размер связывающего места и константу связывания со своим местом на ДНК для лиганда. Лиганд и краситель не могут занимать одни и те же места на ДНК и их связывающие места не могут перекрываться. Такое связывание мы будем называть конкурентным. Для описания конкурентного связывания красителя и лиганда с ДНК будем использовать уравнения, полученные ранее в работе [15]. Эти уравнения позволяют описать связывание как красителя, так и лиганда — тестируемого соединения.

Запишем эти уравнения в виде условий химического равновесия:

$$\frac{r_0}{K_0 \cdot c_{f0}} = \left(\frac{1 - r_0 \cdot L_0 - r_1 \cdot L_1}{1 - r_0 \cdot (L_0 - 1) - r_1 \cdot (L_1 - 1)} \right)^{L_0} (1 - r_0 \cdot (L_0 - 1) - r_1 \cdot (L_1 - 1)), \quad (1)$$

$$\frac{r_1}{K_1 \cdot c_{f1}} = \left(\frac{1 - r_0 \cdot L_0 - r_1 \cdot L_1}{1 - r_0 \cdot (L_0 - 1) - r_1 \cdot (L_1 - 1)} \right)^{L_1} (1 - r_0 \cdot (L_0 - 1) - r_1 \cdot (L_1 - 1)), \quad (2)$$

где r_0 — степень заполнения ДНК красителем, c_{f0} — концентрация свободной формы красителя, r_1 — степень заполнения ДНК лигандом, c_{f1} — концентрация свободной формы лиганда в растворе.

Уравнения (1) и (2) позволяют рассчитывать теоретические изотермы адсорбции (кривые связывания) для любых параметров. Для анализа экспериментальных данных эти соотношения следует дополнить уравнениями баланса. Если в эксперименте мы добавляем лиганды и краситель в раствор, содержащий определенную концентрацию ДНК C_N (в парах нуклеотидов), тогда можно определить концентрацию свободного красителя и лиганда:

$$c_{f0} = c_0 - r_0 \cdot C_N, \quad (3)$$

$$c_{f1} = c_1 - r_1 \cdot C_N, \quad (4)$$

где c_0 — полная концентрация красителя в растворе, c_1 — полная концентрация лиганда в растворе.

Подставляя концентрации свободного красителя и свободного лиганда, выраженные через полные их концентрации и заполнения в уравнения (1) и (2), получаем систему из двух уравнений для двух неизвестных (r_0 и r_1) с четырьмя параметрами: L_0 , K_0 , L_1 и K_1 . Параметры связывания красителя известны, система уравнений (1)–(2) может быть решена и аппроксимирована к экспериментальным данным подбором параметров, описывающих связывание лиганда.

В нашей работе параметры взаимодействия красителя с ДНК (L_0 и K_0) были определены независимо в отсутствие конкурирующего лиганда и аппроксимированы уравнением связывания протяженного лиганда на линейной матрице [11–14]:

$$\frac{r_0}{K_0 \cdot c_{f0}} = \left(\frac{1 - r_0 \cdot L_0}{1 - r_0 \cdot (L_0 - 1)} \right)^{L_0} (1 - r_0 \cdot (L_0 - 1)). \quad (5)$$

В эксперименте измеряется сигнал связанного красителя — интенсивность флуоресценции I . Эта величина может быть рассчитана из концентрации связанного с ДНК красителя:

$$I = I_c r_0 C_N, \quad (6)$$

где I_c — интенсивность флуоресценции полностью связанного лиганда.

Численное решение системы уравнений относительно переменных r_1 и r_0 осуществляли с использованием функции `root` из библиотеки `scipy.optimize` в Python. Размер связывающего места (L_1) и константу связывания (K_1) для тестируемого лиганда мы находили, решая систему уравнений (1)–(2). Аппроксимацию значения флуоресценции выполняли методом наименьших квадратов, отклонение теоретической кривой от экспериментальных данных минимизировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристики взаимодействия с ДНК конкурирующих лигандов. Описанная нами математическая модель позволяет рассмотреть, как будет меняться заполнение ДНК красителем в присутствии конкурирующего лиганда при фиксиро-

ванных параметрах связывания красителя. Мы задавали константу связывания K_0 и размер связывающего участка L_0 . Также была задана концентрация ДНК, а параметры конкурирующего лиганда K_1 и L_1 изменялись в соответствии с заданными наборами значений.

На рис. 1 представлена зависимость заполнения ДНК красителем в зависимости от общей концентрации красителя (C_0) и общей концентрации конкурирующего лиганда (C_1). Параметр заполнения ДНК красителем количественно пропорционален экспериментально наблюдаемому изменению флуоресценции, что делает его удобным для анализа взаимодействий в системе.

Из полученных зависимостей видно, что при низких концентрациях лиганда по мере роста общей концентрации красителя наблюдается рост заполнения ДНК красителем, независимо от параметров связывания конкурента. Это характерное поведение объясняется тем, что в условиях низкой конкуренции краситель практически полностью использует доступные участки ДНК, соответствующие его параметрам связывания. Рост заполнения в этом случае показывает связы-

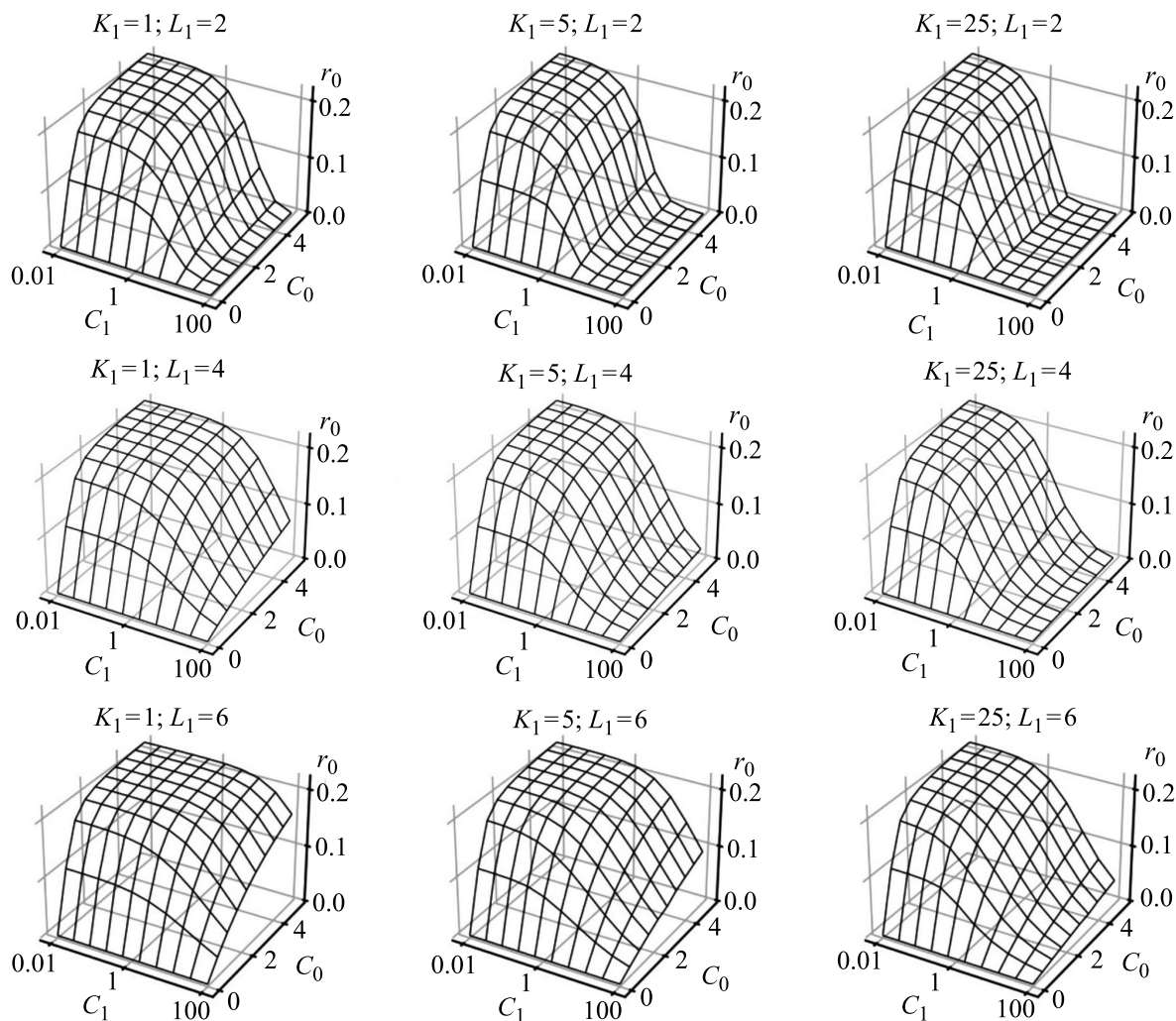


Рис. 1. Зависимости заполнения ДНК красителем от общей концентрации красителя (C_0) и общей концентрации конкурирующего соединения (C_1) при разных параметрах связывания конкурента, которые указаны над графиками. Параметры связывания флуоресцирующего красителя ($K_0 = 10.0$, $L_0 = 4$) и концентрация ДНК ($C_N = 5.0$) фиксированы.

вание красителя на линейной матрице, где конкуренция незначительна.

С увеличением концентрации лиганда начинают проявляться эффекты конкурентного связывания. Наблюдается уменьшение прироста заполнения красителем при увеличении его концентрации, что связано с частичным блокированием доступных участков ДНК конкурентом. Это приводит к перераспределению связывания между красителем и лигандом в зависимости от их констант связывания и размеров их мест связывания.

При фиксированной концентрации красителя добавление лиганда вызывает снижение заполнения ДНК красителем, что проявляется как уменьшение наблюдаемой флуоресценции. Снижение флуоресценции зависит от параметров лиганда: чем выше его константа связывания (K_1) и мень-

ше размер связывающего участка (L_1), тем меньше концентрация связанного красителя (меньше сигнал). Последнее наблюдение кажется парадоксальным, но малые лиганды более эффективно вытесняют большие с ДНК, так как при их связывании увеличивается статистическая энтропия (увеличивается число возможных перестановок лигандов на ДНК).

Кроме того, форма кривой $r_0(C_1)$ варьируется не только из-за параметров конкурента, но и в зависимости от концентрации красителя. При высоких концентрациях красителя (C_0) конкуренция проявляется менее выражено, так как большинство доступных участков ДНК занято красителем. Наоборот, при низкой концентрации красителя эффект уменьшения сигнала («тушения») более заметен, так как добавление кон-

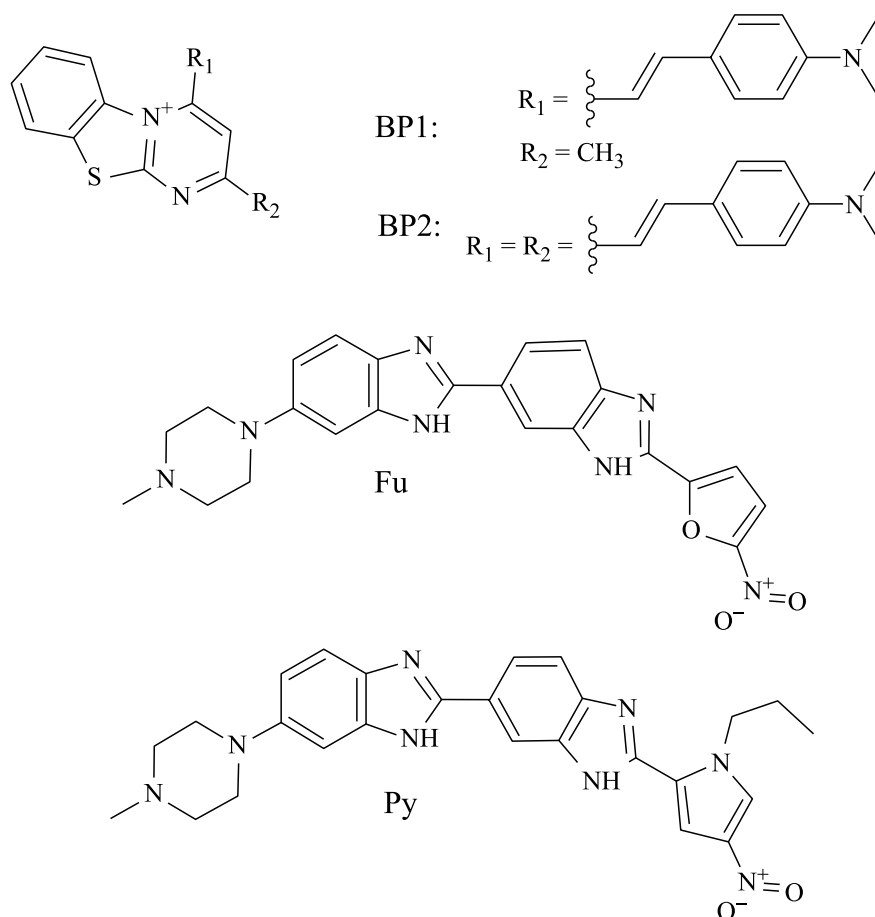


Рис. 2. Структурные схемы тестируемых соединений (пояснения в тексте).

курента существенно изменяет распределение молекул.

Таким образом, результаты расчетов демонстрируют сложный характер конкурентного взаимодействия двух лигандов с ДНК, который определяется не только параметрами связывания, но и соотношением концентраций компонентов в системе.

Химическая структура тестируемых ДНК лигандов. Для определения параметров взаимодействия лигандов с ДНК были выбраны две серии низкомолекулярных соединений, для которых классические спектральные методы тестирования оказались малоэффективными в оценке параметров связывания (рис. 2).

Первая серия соединений (BP1 и BP2) представляет конденсированные пиримидобензотиазолиевые трициклические системы, содержащие узловой кватернизованный атом азота и один либо два 4-диметиламиностирильных заместителя в качестве боковых цепей пиримидиниевого фрагмента трицикла [22, 23]. Предполагается, что

ароматическое ядро данных соединений способствует их интеркаляции в ДНК, что делает их потенциальными конкурентами классических интеркаляторов. Эти соединения были протестированы в системе с интеркалятором EtBr, который используется в качестве референтного лиганда для изучения интеркаляционного связывания.

Вторая серия соединений представляет собой производные бис-бензимидазола Hoechst 33258 с замещением фенильной группы на нитрофурановый (Fu) и нитропиррольный (Py) фрагмент. По аналогии с исходным соединением Hoechst 33258, которое является классическим лигандом малой бороздки ДНК, предполагалось, что данные производные также связываются по малой бороздке. Для проверки этой гипотезы было изучено их конкурентное взаимодействие с флуоресцирующим лигандом Hoechst 33258 на модели гомотополимерной ДНК поли(dAdT).

Обе серии соединений имеют разнообразие структурных модификаций, которые могут суще-

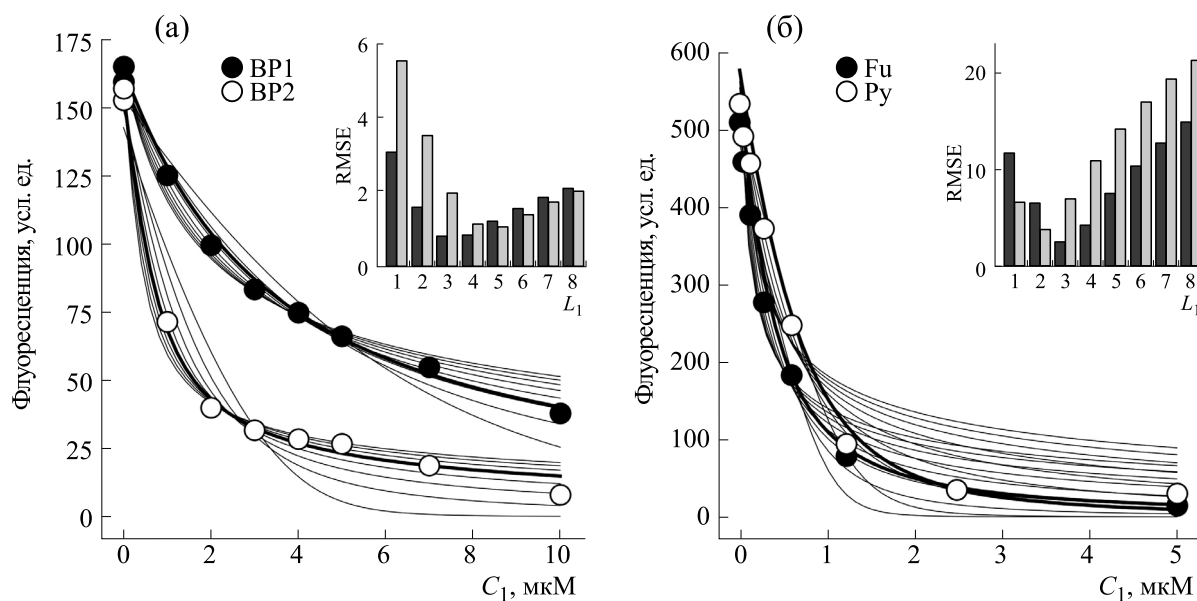


Рис. 3. Экспериментальные и теоретические зависимости интенсивности флуоресценции красителей при увеличении концентрации лигандов в растворе: (а) — краситель EtBr в концентрации $C_0 = 5$ мкМ, титрование лигандами BP1 и BP2 ДНК спермы лосося; (б) — краситель Hoechst 33258 в концентрации $C_0 = 0.25$ мкМ, титрование лигандами Fu и Py полимера поли(dAdT).

ственно влиять на их взаимодействие с ДНК. Для соединений первой серии ключевым фактором является способность ароматического ядра стабилизировать интеркаляцию, тогда как введение дополнительной 4-диметиламиностирильной группы позволяет оценить влияние этой модификации на связывание с ДНК. Во второй серии определяющую роль играют стерические и электронные свойства модификаций лигандов, влияющих на их способность к взаимодействию в малой бороздке. Изучение конкурентных взаимодействий с использованием модельных ДНК-систем предоставляет возможность детально охарактеризовать параметры связывания, включая константы связывания и размеры связывающих участков, что значительно расширяет возможности традиционных спектральных методов.

Определение параметров связывания ДНК лигандов по кривым тушения красителей. Для получения характеристик взаимодействия лигандов с ДНК были получены кривые, соответствующие уменьшению флуоресценции («тушению») красителей при увеличении концентрации тестируемых соединений. Зависимость флуоресценции красителей от концентрации лигандов в растворе представлена на рис. 3 открытыми и заполненными маркерами. При высоких концентрациях конкурента флуоресценция красителя либо не наблюдалась, либо имела пренебрежимо малую величину, что свидетельствует о почти полном

тушении флуоресценции красителя. Эффективность тушения зависела от типа соединений, что, вероятно, объясняется различиями в параметрах связывания конкурентов с ДНК. Конкуренты с более высокими константами связывания или с большей аффинностью к определенным участкам ДНК способны более эффективно вытеснять флуоресцирующий краситель, что приводит к более выраженному тушению флуоресценции.

Для определения параметров связывания была проведена аппроксимация экспериментальных

Таблица 1. Оптимизированные параметры связывания

Соединение	K , мкМ ⁻¹	L , п.о.
Этидий бромид (EtBr)	0.11	3
BP1	0.33	3
BP2	3.40	5
Hoechst 33258 (Hoechst)	14.0	4
Fu	11.4	3
Py	4.8	2

данных теоретическими кривыми. Параметры связывания красителей были определены экспериментально в аналогичных условиях титрованием ДНК красителем в отсутствие конкурирующей молекулы. Полученные параметры для красителей приведены в табл. 1 жирным шрифтом. Константа связывания тестируемых соединений определялась путем поиска наилучшего соответствия теоретических кривых экспериментальным точкам. Использовался метод наименьших квадратов (с оптимизацией функции отклонений для различных фиксированных длин лиганда). Полученные кривые представлены тонкими линиями. Зависимость нормированного среднеквадратичного отклонения (RMSE) от заданной длины тестируемого лиганда приведена в виде врезки к рисунку. Минимальное значение этого отклонения соответствует наилучшим параметрам аппроксимации и приведено в табл. 1. Кривые, соответствующие минимальному отклонению, приведены жирной линией на рис. 3.

Полученные результаты демонстрируют эффективность предложенного подхода к определению параметров связывания с ДНК для соединений, у которых затруднено использование изменения собственных спектральных свойств.

В серии соединений BP1 и BP2 был установлен интеркаляционный тип связывания, подтвержденный конкуренцией с EtBr. Соединение BP1 демонстрирует сходный с красителем характер связывания с ДНК, при этом константа образования интеркаляционного комплекса составляет около $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, а длина связывающего участка равна 3 парам нуклеотидов. В отличие от него, соединение BP2 с дополнительной стерильной группой проявляет значительно более эффективное вытеснение интеркалирующего красителя EtBr. Это обусловлено константой связывания, равной $3.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, т.е. в 10 раз превышающей значение для BP1, и увеличенной длиной связывающего участка до 5 пар нуклеотидов. Вероятно, дополнительная стерильная группа вносит вклад в усиление связывания за счет дополнительных взаимодействий с ДНК.

Взаимодействие бисбензимидазольных соединений Fu и Ru с ДНК характеризуется высокой эффективностью вытеснения бороздочного лиганда и значительным тушением его флуоресценции. Полученные параметры связывания демонстрируют, что аффинность соединения Fu к АТ-содержащему гомополимеру ДНК лишь незначительно ниже, чем у соединения Hoechst 33258, в то время как константа связывания соединения Ru оказалась примерно в три раза меньше. Число пар оснований, занимаемых одним лигандом,

определенное из наилучшей аппроксимации, составляет две и три пары для Fu и Ru соответственно, несмотря на увеличенную длину лигандов, обусловленную добавлением нитрофурановой и нитропиррольной групп. Возможность образования димерных комплексов этих лигандов с ДНК согласуется с полученными результатами. Однако для более точного описания такого взаимодействия может потребоваться модификация теоретической модели связывания и изменение экспериментальных условий, позволяющих наблюдать образующиеся комплексы, и привлечение экспериментальных данных другого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты открывают новые перспективы для дизайна и синтеза ДНК-тропных соединений с заданными свойствами. Установленные параметры связывания и механизмы взаимодействия с ДНК позволяют целенаправленно модифицировать структуру соединений для повышения их аффинности, специфичности и функциональной активности.

Применение предложенного подхода для анализа конкурентного связывания предоставляет эффективный инструмент для изучения взаимодействий сложных систем лигандов с ДНК, особенно в случаях, когда прямое наблюдение спектральных характеристик затруднено. Аналогичные теоретические модели могут быть развиты для количественной характеристики взаимодействия низкомолекулярных соединений с альтернативными структурами ДНК [24]. Это открывает возможность разработки и тестирования соединений с предсказуемыми параметрами связывания для использования в биомедицинских и аналитических приложениях, включая создание новых лекарственных средств и разработку диагностических инструментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Синтез и тестирование производных бисбензимидазолов выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00082).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Healy E. F. Quantitative determination of DNA–ligand binding using fluorescence spectroscopy. *J. Chem. Education*, **84** (8), 1304 (2007). DOI:10.1021/ed084p1304
2. Zasedatelev A. S., Gursky G. V., Zimmer C. H., and Thrum H. Binding of netropsin to DNA and synthetic polynucleotides. *Mol. Biol. Reports*, **1** (6), 337–342 (1974). DOI: 10.1007/BF00309567
3. del Villar-Guerra R., Gray R. D., Trent J. O., and Chaires J. B. A rapid fluorescent indicator displacement assay and principal component/cluster data analysis for determination of ligand–nucleic acid structural selectivity. *Nucl. Acids Res.*, **46** (7), e41–e41 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky019
4. Tse W. C. and Boger D. L. A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity. *Accounts Chem. Res.*, **37** (1), 61–69 (2004). DOI: 10.1021/ar030113y
5. Dömötör O., Binacchi F., Ribeiro N., Busto N., Gonzalez-García J., Garcia-España E., Correia I., Enyedy É. A., Hamacek J., Terenzi A., Basilio N., Barone G., Cavaco I., and Biver T. How reliable is the evaluation of DNA binding constants? Insights and best practices based on an inter-laboratory fluorescence titration study. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **327**, 125354 (2025). DOI: 10.1016/j.saa.2024.125354
6. Lepceq J. B. and Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical–chemical characterization. *J. Mol. Biol.*, **27** (1), 87–106 (1967). DOI: 10.1016/0022-2836(67)90353-1
7. Bazhulina N. P., Nikitin A. M., Rodin S. A., Surovaya A. N., Kravatsky Y. V., Pismensky V. F., Archipova V. S., Martin R., and Gursky G. V. Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **26** (6), 701–718 (2009). DOI: 10.1080/07391102.2009.10507283
8. Haq I., Ladbury J. E., Chowdhry B. Z., Jenkins T. C., and Chaires J. B. Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)2 duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.*, **271** (2), 244–257 (1997). DOI: 10.1006/jmbi.1997.1170
9. Bradley D. and Lifson S. Statistical mechanical analysis of binding of acridines to DNA. In: *Molecular associations in biology* (Proc. Int. Symp. Held in Celebration of the 40th Anniversary of the Institute de Biology Physico-Chimique). Ed. by B. Pullman (Acad. Press, 2012), pp. 261–270. DOI: 10.1016/B978-0-12-395638-5.50021-5
10. Latt S. A. and Sober H. A. Protein–nucleic acid interactions. II. Oligopeptide–polyribonucleotide binding studies. *Biochemistry*, **6** (10), 3293–306 (1967). DOI: 10.1021/bi00862a040
11. Crothers D. M. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. *Biopolymers*, **6** (4), 575–584 (1968). DOI: 10.1002/bip.1968.360060411
12. Заседателев А. С., Гурский Г. В. и Волькенштейн М. В. Теория одномерной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере. *Молекуляр. биология*, **5** (2), 245–490 (1971).
13. Нечипуренко Ю. Д. и Бучельников А. С. Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами в растворе и на микрочипах. *Биофизика*, **67** (3), 456–466 (2022). DOI: 10.31857/S000630292203005X, EDN: ANDOHN
14. McGhee J. D. and von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA–protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.*, **86** (2), 469–489 (1974). DOI: 10.1016/0022-2836(74)90031-x
15. Нечипуренко Ю. Д. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. II. Контактные кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами. *Молекуляр. биология*, **18**, 1066–1079 (1984).
16. Nechipurenko Y. D. and Gursky G. V. Cooperative effects on binding of proteins to DNA. *Biophys. Chem.*, **24** (3), 195–209 (1986).
17. Нечипуренко Ю. Д. *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (ИКИ, Ижевск, 2015).
18. Torralba A. S., Colmenarejo G., and Montero F. Sequence distribution and intercooperativity detection for two ligands simultaneously binding to DNA. *Biopolymers*, **58** (6), 562–576. DOI: 10.1002/1097-0282(200105)58:6<562::AID-BIP1031>3.0.CO;2-8
19. Nechipurenko Y. D., Mikheikin A. L., Streltsov S. A., Zasedatelev A. S., and Nabiev I. R. Mixed Mode of Ligand–DNA Binding Results in S-Shaped Binding Curves. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **18** (5), 703–708 (2001). DOI: 10.1080/07391102.2001.10506700
20. Круглова, Е. Б. и Зиненко Т. Л. Экспериментальные и теоретические исследования образования комплексов ДНК с биологически активными лигандами, содержащими хромофорные группы, в зависимости от ионной силы раствора. *Молекуляр. биология*, **27** (3), 655–665 (1993).
21. Schwarz G. and Stankowski S. Linear cooperative binding of large ligands involving mutual exclusion of different binding modes. *Biophys. Chem.*, **10** (2), 173–181 (1979). DOI: 10.1016/0301-4622(79)85037-1
22. Шульга С. И. и Чуйгук В. А. Полиметиновые красители из тиазоло[3,2-а]пиримидиниевых пиримидо[2,1-б]бензтиазолиевых солей. *Укр. хим. журн.*, **39** (11), 1151–1155 (1973).
23. Zhao Z. and Hartmann H. Synthesis of reactive condensation products of acetylacetone and their transformation into deeply coloured methine dyes. *J. Prakt. Chem.*, **342** (3), 249–255 (2000). DOI: 10.1002/(sici)1521-3897(200003)342:3<249::aid-prac249>3.0.co;2-8
24. Monchaud D. and Teulade-Fichou M.-P. G4-FID: A fluorescent DNA probe displacement assay for rapid evaluation of quadruplex ligands. *Methods Mol. Biol.*, **608**, 257–271 (2010). DOI: 10.1007/978-1-59745-363-9_15

Analysis of Competitive Ligand Binding to DNA: Using Dyes as Fluorescent Sensors

Y.D. Nechipurenko^{*, **}, E.A. Novikova^{*}, N.M. Smirnov^{*}, K.K. Khorunzheva^{***}, B.V. Paponov^{****},
A.F. Arutyunyan^{*}, and D.N. Kaluzhny^{*}

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***Research Institute for Brain Development and Peak Performance, RUDN University,
ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia*

****Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

*****Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6-8, Saint Petersburg, 197022 Russia*

Determination of interaction parameters of low molecular weight compounds with DNA is difficult in cases where compounds do not exhibit appreciable fluorescence or their spectral changes are difficult to interpret. To solve this problem, an approach involving the use of known fluorescent dyes competitively binding on DNA is proposed. This approach uses a model describing the competitive binding of two extended ligands on a linear DNA matrix. This model allows approximation of experimental data and determination of binding parameters corresponding to two non-fluorescent types of ligands. The first type of ligands exhibits intercalation binding to DNA and competes with ethidium bromide, while the second type binds along a narrow groove and competes with Hoechst 33258 dye.

Keywords: competitive binding of ligands to DNA, thermodynamic models, adsorption isotherms, binding equations, adsorption isotherm analysis, Hoechst 33258, ethidium bromide