CHIMICA & COMPLESSI METALLICI

Alessia Boggioni Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale Università di Pisa alessiab@ns.dcci.unipi.it

COLORANTI PER BIOSUBSTRATI AGGREGAZIONE E LEGAME CON IL DNA

CIANINE

Le cianine sono oggi largamente utilizzate come coloranti per biosubstrati, ciononostante manca un'analisi approfondita delle caratteristiche di questi

Sistemi. Riportiamo i risultati di uno studio delle proprietà di alcune cianine in soluzione e del meccanismo della loro interazione con il DNA.

coloranti della famiglia delle cianine sono noti da più di un secolo ma l'interesse verso questa classe di molecole fluorescenti è aumentato solo in tempi più recenti [1]. Le cianine sono utilizzate in svariate applicazioni tecnologiche ed industriali, tuttavia, il loro utilizzo principale riguarda l'ambito biomedico e biochimico, dove sono impiegate come agenti antitumorali [2] e come rivelatori per biosubstrati [3], in particolare acidi nucleici. Infatti, possiedono la proprietà di aumentare notevolmente la propria fluorescenza in seguito all'interazione con tali sostanze [4]. Attualmente sono in corso svariati studi rivolti alla sintesi di nuove molecole della classe delle cianine che siano in grado di riconoscere in modo selettivo particolari sequenze di polinucleotidi [5]. L'interazione di una cianina con un polinucleotide può avvenire attraverso la penetrazione del colorante all'interno dello spazio esistente tra due coppie di basi consecutive dell'acido nucleico (intercalazione [6]) oppure il colorante si può adagiare lungo le scanalature della doppia elica (groove binding [7]). Inoltre, poiché le cianine sono fortemente soggette a fenomeni di autoaggregazione [8] è possibile la formazione di un terzo tipo di complesso, dove un elevato numero di monomeri di colorante si aggrega sulla superfi-

Ad Alessia Boggioni è stato conferito il premio Pulidori 2007 nell'ambito del convegno ISMEC 2007, organizzato lo scorso giugno dal Dipartimento di Scienze chimiche dell'Università di Cagliari.



Fig. 1 - (A) TO = 1-metil-4-[(3-metil-2(3H)-benzotiazolidene)metil] metil solfato; (B) BO = 3-metil-2-[(1-metil-4(1H)-piridinilidene)metil] metil solfato; (C) CCyan2 = 3-metil-2-[2-metil-3-(3-metil-2(3H)-benzotiazolidene)-1propenil] ioduro; (D) Cyan40 = 3-metil-2-[(1,2,6-trimetil-4(1H)piridinilidene)metil] metil solfato

Autoaggregazione del colorante

Sono stati registrati gli spettri di assorbimento a diversa concentrazione di colorante. Negli esempi riportati (Fig. 2) si può osservare come nel BO ad alte concentrazioni appaia una nuova banda, spostata a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quella tipica del monomero. Nel caso del TO per concentrazioni elevate, si osserva la crescita di una banda spettrale a lunghezze d'onda minori rispetto a quella predominante alle basse concentrazioni. La nascita di nuove bande in condizioni di elevata concentrazione e le deviazioni dell'assorbanza dalla linearità predetta dalla legge di Beer-Lambert sono indicative della formazione di aggregati. Il comportamento della cianina CCyan2 è analogo a quello del TO, mentre la cianina Cyan40 sembra mostrare una tendenza all'ag-



Fig. 2 - Spettri di assorbimento delle cianine BO e TO a diverse concentrazioni; I = 0,1 M (NaCl), pH = 7,0, T = 25 °C. A) BO (cammino ottico = 0,2 cm) CD = $5,3x10^{-5}$ M \div 2,4×10⁻⁴M; B) TO (cammino ottico = 0,1 cm) CD = $6,0\times10^{-6}$ M \div 1,6×10⁻⁴M. Le caratteristiche spettrali rivelano il verificarsi di fenomeni aggregativi

cie esterna del polinucleotide. Tali complessi esterni si formano a bassi rapporti polinucleotide/colorante (C_P/C_D) e sono stabilizzati da interazioni colorante-colorante [9], mentre ad alti rapporti C_P/C_D prevale la reazione di intercalazione del monomero [10]. Per meglio comprendere il meccanismo dell'interazione di alcune cianine con gli acidi nucleici, è stato condotto uno studio termodinamico e cinetico dell'interazione delle quattro molecole riportate in Fig. 1 con il DNA. I metodi cinetici impiegati hanno permesso non solo di analizzare i dettagli del processo d'intercalazione, ma anche di comprendere quale tra gli stadi dello schema reattivo è maggiormente affetto da cambiamenti nella struttura del colorante.

Risultati e discussione

Lo studio termodinamico è stato condotto attraverso misure spettrofotometriche e spettrofluorometriche, mentre per l'analisi cinetica sono state sfruttate la tecnica del salto di temperatura (T-jump [11]), che consente lo studio di reazioni che avvengono in tempi compresi tra il microsecondo e il secondo, e la tecnica del flusso arrestato (stoppedflow [12]), che consente lo studio di reazioni nel campo dei secondi. gregazione molto inferiore. Il processo di aggregazione per le cianine TO e CCyan2 è stato analizzato cineticamente utilizzando la tecnica T-jump con rivelazione in assorbanza. Le curve di rilassa-



CHIMICA & COMPLESSI METALLICI

Tab. 1 - Parametri di reazione per il processo di autoaggregazione di alcune cianine. I parametri relativi al noto intercalante proflavina sono riportati per confronto. I = 0,1M (NaCl), pH = 7,0, T = 25 °C. Ref. [19]							
	10 ⁻⁸ k _f (M ⁻¹ s ⁻¹)	10 ⁻⁴ k _d (s ⁻¹)	10 ⁻³ K _D (M ⁻¹)				
то	8,0±1,9	2,6±0,7	31±16				
во	-	-	0,22±0,07				
CCyan2	0,86±0,03	4,1±0,2	2,1±0,04				
Proflavina	>10	-	0,4				

mento ottenute sono monoesponenziali e il reciproco del tempo di rilassamento varia linearmente con la concentrazione di colorante (Fig. 3). L'andamento monoesponenziale consente di razionalizzare il processo sulla base di una singola reazione di dimerizzazione

$$k_{d} = 2D \rightleftharpoons D_{2}$$

$$k_{f}$$
(1)

dove $k_f e k_d$ sono rispettivamente le costanti cinetiche di formazione e di dissociazione del dimero.

I punti sperimentali, sulla base del modello della dimerizzazione, sono interpolabili per mezzo dell'equazione lineare $1/\tau = k_d + 4k_f C_D$ che permette l'ottenimento di k_f, k_d e, come loro rapporto, della costante di equilibrio K_D per la formazione del dimero. L'analisi combinata dei dati spettrofotometrici e cinetici ha permesso di ricavare i parametri riportati in Tab. 1. La presenza di un anello aromatico aggiuntivo, che amplia la superficie planare del TO rispetto a quella del BO, potrebbe essere la causa della spiccata tendenza del TO ad autoaggregarsi; tuttavia, anche la geometria molecolare gioca un ruolo importante. Infatti, il valore di K_D per il TO è un ordine di grandezza superiore a quello del CCyan2, molecola che presenta un'estesa coniugazione mentre nel Cyan40, sembra che la presenza di due residui metilici limiti la formazione di aggregati. Dal punto di vista cinetico, possiamo osservare che, nel caso del TO, le costanti relative alla formazione del dimero, sono particolarmente elevate. Si noti che il BO è l'unico dei quattro coloranti studiati a presentare la banda dell'aggregato a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quella del



monomero. Questo effetto indica la formazione di aggregati con importante sfalsamento delle molecole, mentre uno shift ipsocromico è indice di presenza di aggregati con alta sovrapposizione molecolare [13]. Questo risultato è stato confermato da calcoli teorici (Hyperchem 7.0) che indicano che nel caso del TO la forma dimera più stabile è quella con la più alta sovrapposizione, mentre nei dimeri del BO la sovrapposizione risulta minore e i due residui rimanenti adottano in predominanza una configurazione cis (Fig. 4).

Interazione DNA/colorante: equilibri

Il DNA utilizzato è di tipo naturale (calf thymus) ed è stato sottoposto ad ultrasuoni in modo da ridurne la lunghezza fino a circa 800 paia di basi; tale riduzione consente di minimizzare fenomeni legati al ripiegamento del polinucleotide. Le titolazioni spettrofotometriche del sistema DNA/cianina sono condotte aggiungendo quantità crescenti di DNA al colorante. Nel caso del TO si è osservata in un primo momento una diminuzione del segnale, mentre, per ulteriori aggiunte di polimero, l'assorbanza del sistema aumenta (Fig. 5). Tale comportamento bifasico è interpretabile assumendo che nella prima fase, dove è presente un eccesso di colorante, questo si aggreghi lungo l'elica del polinucleotide, mentre nella seconda fase, in cui è presente un eccesso di DNA, avvenga il processo di intercalazione del monomero. Il fatto che questo comportamento bifasico venga osservato solamente nel caso del TO è in accordo con la spiccata tendenza di questo colorante a formare aggregati. Nelle titolazioni di fluorescenza è stato possibile lavorare con concentrazioni di colorante più basse (10⁻⁶÷10⁻⁷ M contro 10⁻⁵ M) e in queste condizioni il comportamento è risultato essere monofasico per tutti i sistemi. I dati sperimentali sono stati analizzati per mezzo dell'equazione di McGhee e von Hippel [14] che, dai parametri ottici espressi in funzione della concentrazione dei reagenti, consente di determinare la costante di equilibrio, K, per la formazione del complesso DNA/colorante, e la dimensione del sito, n, definita come il numero di unità monomeriche del polimero coinvolte nel legame con una molecola di colorante in condizioni di saturazione. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tab. 2.

La costante di equilibrio dipende dalla concentrazione salina del mezzo (Fig. 6), in accordo con l'equazione di Manning e Record [15]. L'interpolazione lineare dei dati di LogK in funzione di -Log[Na+] fornisce come pendenza il numero di ioni sodio allontanati in seguito al legame di una molecola di colorante, e come intercetta LogK_{nel} dove K_{nel} è la costante di equilibrio in assenza di contributi elettrostatici. I valori della pendenza delle rette di Fig. 6 sono simili e vicini all'unità, in accordo con la carica positiva portata dai coloranti studiati. Si noti nuovamente che, nonostante TO e BO presentino strutture molto simili, esistono importanti differenze nella loro affinità verso il DNA.

Tab. 2 - Parametri cinetici e termodinamici di sistemi DNA/ cianina. pH = 7,0, I = 0,1M (NaCl), T = $25 \degree$ C									
Colorante	n	10-4K M-1	10 ⁻³ К ₀ М ⁻¹	10 ⁻³ k ₁ s ⁻¹	10 ⁻³ k ₋₁ s ⁻¹	10 ⁻¹ k ₂ s ⁻¹	10 ⁻¹ k ₋₂ s ⁻¹		
TOa	2,1	24±9 ^c 17±3 ^d	15±2	1,6±0,1	0,45±0,05	15±1	6,1±0,7		
BOª	2,1	4,0±0,9c 2,1±0,3d	<2	>10	2,2±0,1	15±1	4,8±0,2		
Cyan40 ^b	2,0	3,2±1,2° 2,4±0,1 ^d	9,8±1,8	5,9±1,2	3,9±0,5	9,2±0,9	8,0±0,7		
CCyan2 ^b	2,0	6,8±1,4° 6,8±0,1 ^d	7,6±0,4	5,4±0,3	1,3±0,2	1,3±0,4	1,1±0,3		

^a ref. [19]; ^b ref. [20]; ^c dai dati cinetici: $K = K_0 K_1 (1+K_2)$; ^d dai dati termodinamici

menti di tipo G-C (affinità rispettivamente 5 e 10 volte superiore).

Interazione DNA/colorante: cinetiche

Al fine di verificare se le cianine sono in grado di discriminare tra coppie di basi differenti, sono state eseguite titolazioni anche usando i polinucleotidi sintetici poly(dA-dT)₂ e poly(dGdC)₂. Se BO e Cyan40 non sembrano mostrare selettività, le cianine TO e CCyan2 sem-

brano invece preferire appaia-

Per tutti i sistemi, lo studio cinetico dell'interazione DNA/colorante ha evidenziato due tempi di rilassamento. L'effetto veloce è stato analizzato tramite la tecnica T-jump, mentre quello lento è stato valutato sia con il T-jump sia con la tecnica stopped-flow. L'analisi dei dati cinetici è presentata nella Fig. 7. La curvatura presente nel grafico dell'effetto veloce, $1/\tau_f vs.$ ([P]+[D]), per il sistema DNA/TO (Fig. 7A), indica che esso è composto di una successione di due stadi, dove il primo è troppo veloce per essere direttamente osservato. Invece, la curvatura presentata dal grafico $1/\tau_s vs.$ ([P]+[D]) (Fig. 7B) rappresenta un processo successivo a quello rapido. Nel complesso, il meccanismo dell'interazione tra le cianine studiate ed il DNA consiste dunque in un processo sequenziale a tre stadi

$$\begin{array}{cccc}
K_0 & k_{-1} & k_{-2} \\
D + S \rightleftharpoons D,S \rightleftharpoons DS_I \rightleftharpoons DS_{II} \\
k_1 & k_2
\end{array} (2)$$

 $Fig. 5 - Spettri di assorbanza per una titolazione spettrofotometrica del sistema DNA/TO; CD = 1,0x10^{-5} M, (a) Cp = 0 M, (b) CP = 1,2x10^{-5} M, (c) CP = 2,3x10^{-4} M; 1 = 0,1 M (NaCl), pH = 7,0, T = 25 °C. Il comportamento bifasico del sistema appare chiaramente$

dove D,S, DS_I e DS_{II} sono complessi polimero/colorante struttural-

mente diversi. L'analisi dei dati sperimentali fornisce i parametri relativi ad ogni singolo stadio del processo reattivo (Tab. 2). In sistemi in cui la cianina interagisce esternamente con il DNA (groove binding) [16], viene osservato un meccanismo ad un solo stadio che mostra un alto valore della costante di velocità diretta (3,4x108 M-1s-1), in accordo con un processo controllato dalla diffusione che suggerisce l'immediata accessibilità del colorante ai siti di legame del polimero. Nel meccanismo di reazione proposto per le cianine studiate, invece, in primo luogo si forma con una cinetica molto veloce un complesso esterno D,S, che si trasforma in DS₁ e DS₁₁, due forme diversamente intercalate nella doppia elica. L'accordo tra le costanti di equilibrio ottenute direttamente dai dati termodinamici e come combinazione delle costanti cinetiche, conferma la correttezza del meccanismo proposto. I valori di K₀, calcolati sulla base della teoria elettrostatica applicata ai polielettroliti, dovrebbero essere gli stessi per leganti aventi la medesima carica e dell'ordine di grandezza di 10² M [17]. Tutti i dati relativi a K₀ riportati in Tab. 2 sono molto al di sopra di questo valore; ciò indica che è grande il contributo non-elettrostatico alla stabilizzazione del complesso D,S. Considerando che la differenza tra i leganti BO, TO, Cyan40 è data dalla diversa sostituzione all'anello



Fig. 6 - Grafico di LogK in funzione di -log[Na+] per i sistemi DNA/TO (triangoli), DNA/BO (cerchi vuoti), DNA/CCyan2 (quadrati) e DNA/Cyan40 (cerchi pieni). pH = 7,0, T = 25 °C. L'andamento mette in evidenza il contributo elettrostatico al processo di legame

CHIMICA & COMPLESSI METALLICI



piridinico, e che il carattere idrofobico dei residui segue la sequenza di K₀, si può concludere che forze idrofobiche contribuiscono a stabilizzare D,S [18]. La specie D,S potrebbe avere le caratteristiche di un complesso coinvolgente le grooves del polimero, come confermato dal fatto che lo stadio associato a K₀ è molto più veloce degli stadi successivi, le cui costanti di velocità, invece, sono tipiche dei processi intercalativi. Per quanto riguarda il secondo stadio dello schema reattivo, D,S \rightleftharpoons DS_I, nel caso del TO, la velocità di reazione è la più bassa in entrambe le direzioni. Questo

Bibliografia

- [1] B.A. Armitage, Top. Curr. Chem., 2005, 253, 55.
- [2] M. Kawakami et al., J. Med. Chem., 1998, 41, 130.
- [3] T.G. Deligeorgiev, Near-Infrared Dyes for High Technology Applications, Kluwer, Dordrecht, 1998, 125.
- [4] S. Guerrieri et al., Anal. Biochem., 1997, 249, 44.
- [5] D.V. Jarikote *et al.*, *Chem. -Eur. J.*, 2006, **13**, 300.
- [6] T.L. Netzel et al., J. Phys. Chem., 1995, 99, 17936.
- [7] H.J. Karlsson et al., Nucleic Acids Res., 2003, 31, 6227.
- [8] W. West, S. Pearce, J. Phys. Chem., 1965, 69, 1894.
- ^[9] T. Biver et al., Arch. Biochim. Biophys., 2006, **452**, 93.
- [10] J. Nygren et al., Biopolymers, 1998, 46, 39.
- [11] R. Riegler et al., Rev. Sci. Instrum., 1974, 45, 580.

effetto può essere spiegato da un lato con la grande stabilità di D,S per TO (alto valore di K₀), dall'altro con la maggiore superficie del residuo piridinico che in DS₁ interagisce con le grooves del polimero portando ad una stabilizzazione di tale complesso. Per quanto riguarda l'ultimo stadio dello schema di reazione, DS₁ \gtrsim DS₁, i valori alquanto simili dei parametri di reazione per i diversi coloranti suggeriscono che questo stadio corrisponda ad un assestamento all'interno della cavità del DNA del residuo benzotiazolico che è comune a tutte le cianine esaminate.

- [12] T. Biver et al., J. Inorg. Biochem., 2004, 98, 1531.
- [13] W. Miaomiao et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 9977.
- [14] J.D. McGhee, P.H. von Hippel, *J. Mol. Biol.*, 1974, 86, 469.
- [15] M.T. Record et al., Q. Rev. Biophys., 1978, 11, 103.
- [16] S.Y. Brensegem et al., J. Mol. Biol., 2001, 308, 649.
- [17] F.J. Meyer-Almes, D. Pörschke, *Biochemistry*, 1993, **32**, 4246.
- [18] X. Shi, R.B. Macgregor Jr., *Biophys. Chem.*, 2007, **125**, 471.
- [19] T. Biver et al., Arch. Biochem. Biophys., 2007, doi:10.1016/j.abb.2007.04.034.
- [20] T. Biver et al., Biophys. J., 2005, 89, 374.

Cyanine Molecules as Biosubstrate Dyes. Self-aggregation and Interaction with DNA

If molecules of the class of the cyanines are nowadays widely used as high performance dyes for biosubstrates, a detailed analysis of the characteristics of these systems is still missing. We present here the results of a kinetic and thermodynamic study of cyanine dyes properties in solution and of the mechanism of their binding to DNA.