

Биология

УДК 577.113.6

А. П. АНТОНЯН, К. В. ПИРУМЯН, М. С. МИКАЕЛЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ Hoechst 33258 С ДНК

Проведено исследование взаимодействия лиганда Hoechst 33258 с ДНК спектроскопическими (флуоресцентным и абсорбционным) методами. Обнаружено, что этот лиганд с ДНК связывается двумя способами – сильным и слабым. Сильный способ связывания выявляется как флуоресцентным, так и абсорбционным методами, в то время как слабый способ обнаруживается только абсорбционным методом. На основании анализа спектроскопических данных рассчитаны значения параметров связывания K и n .

Введение. Взаимодействие малых молекул с ДНК интенсивно изучается для определения специфичности их связывания, выявления механизмов этих взаимодействий и для понимания влияния этих лигандов на функционирование ДНК. С этой точки зрения определенный интерес представляют низкомолекулярные вещества, обладающие ярко выраженной специфичностью к АТ-последовательностям ДНК. В настоящее время одним из широко исследуемых соединений является Hoechst 33258 (Н33258), который предпочтительнее связывается с ДНК через малый желобок и проявляет высокое сродство к АТ-последовательностям [1–7]. Интерес к этому лиганду обусловлен также и тем, что Н33258 является флуоресцентным красителем ДНК и хромосом и в то же время проявляет высокую биологическую активность [8–10].

Большинство работ, посвященных структурным особенностям комплексов ДНК–Н33258, указывают на то, что этот лиганд предпочтительнее связывается с участками ДНК, содержащими GAATTC-последовательности [11–13]. Однако термодинамические особенности комплексообразования Н33258 с ДНК мало изучены. В этой связи мы задались целью исследовать это взаимодействие и определить термодинамические параметры: константу связывания K и число мест связывания n .

Материалы и методы. В работе были использованы следующие препараты: ДНК тимуса телят, Hoechst 33258 фирмы «Sigma» (США). Все препараты применяли без дополнительной очистки, их концентрацию определяли абсорбционным методом с использованием следующих коэффициентов экстинкции: для ДНК тимуса телят $\varepsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, для Н33258 $\varepsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Исследования проводили при ионной силе $\mu=0,02 \text{ M} [\text{Na}^+]$, $t=25^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,0$.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре PУE Unicam-SP8-100 (Англия). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре FluoroMax (Франция). В измерениях использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

И при абсорбционных, и при флуориметрических исследованиях раствор Н33258 титровали раствором ДНК. Спектры поглощения комплексов были получены в интервале длины волны 220–500 нм, а спектры флуоресценции – 300–600 нм. Возбуждение молекул Н33258 при исследовании флуоресценции осуществлялось при $\lambda=343$ нм, максимум интенсивности флуоресценции соответствовал $\lambda=491$ нм.

Термодинамические параметры связывания (K и n) Н33258 с ДНК были определены из кривых связывания в координатах Скетчарда (зависимость r/C_f от r , где r – число нуклеотидов ДНК, находящихся в комплексе с молекулами лиганда, C_f – концентрация несвязанных молекул лиганда в растворе).

Для получения r/C_f и r из спектров поглощения комплексов Н33258–ДНК определялась C_f с помощью уравнения

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty}, \quad (1)$$

где A – поглощение комплекса при данной концентрации лиганда, A_0 и A_∞ – поглощения полностью свободного и связанного лигандов соответственно, $C_0 = C_f + C_b$ – полная концентрация Н33258 в растворе; C_b – концентрация связанного лиганда, $r = C_b/C_p$, где C_p – концентрация нуклеотидов.

Из спектров флуоресценции рассчитывали концентрацию флуоресцирующих молекул Н33258, используя уравнение

$$\frac{C_b^\phi}{C_0} = \frac{[I - I_1]}{[I_2 - I_1]}, \quad (2)$$

где I , I_1 , I_2 – измеряемые интенсивности флуоресценции исследуемого образца, контрольных образцов со свободными и полностью связанными молекулами лиганда соответственно ($\lambda_{возб}=343$ нм, $\lambda_{фл}=491$ нм); $C_b = C_b^\phi + C_b^{нф}$, где C_b^ϕ , $C_b^{нф}$ – концентрации связанных флуоресцирующих и нефлуоресцирующих молекул Н33258; $r = r^\phi + r^{нф}$, где $r^\phi = C_b^\phi/C_p$, $r^{нф} = C_b^{нф}/C_p$.

Результаты и обсуждение. Для определения термодинамических параметров комплексообразования лигандов с ДНК при анализе экспериментальных данных, описывающих связывание малых молекул с макромолекулами, метод Скетчарда является одним из информативных. Для получения кривых связывания в координатах Скетчарда нами были получены спектры флуоресценции и абсорбции чистого Н33258 и его комплексов с ДНК (рис. 1).

Как видно из приведенного рисунка, интенсивность флуоресценции Н33258 возрастает с увеличением концентрации ДНК (рис. 1, а, кр. 2–7) по сравнению с интенсивностью флуоресценции чистого лиганда (кр. 1). Известно, что при взаимодействии Н33258 с ДНК вблизи основного пика в спектрах флуоресценции обнаруживаются максимумы, обусловленные димеризацией или эксимеризацией молекул лиганда (см. [5]). Однако интенсивность флуо-

ресценции димеров или эксимеров незначительна по сравнению с интенсивностью мономерных форм. Это существенно не искажает полученные данные.

Комплексообразование Н33258 с ДНК было исследовано также абсорбционным методом. На рис. 1, б приведены спектры поглощения чистого Н33258 (кр. 1) и его комплексов с ДНК (кр. 2–7) при $t=25^{\circ}\text{C}$ и рН 7,0. Из

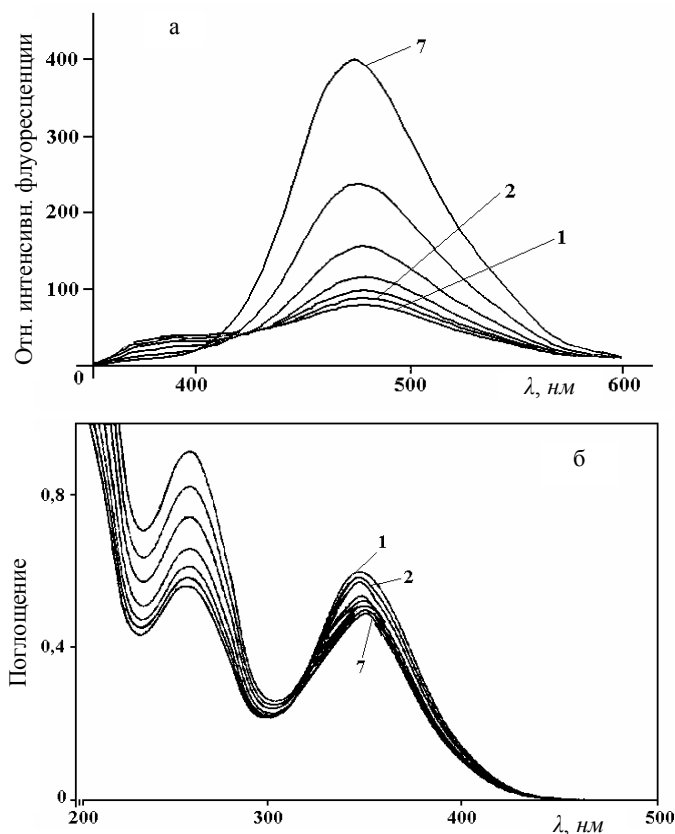


Рис. 1. Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) чистого Н33258 (кр. 1) и его комплексов с ДНК (кр. 2–7).

приведенного рисунка видно, что спектры поглощения комплексов по мере возрастания концентрации ДНК в растворе смещаются в сторону более длинных волн, поскольку концентрация свободных молекул лиганда уменьшается в ходе титрования. Максимум поглощения полностью связанных молекул лиганда соответствует длине волны $\lambda=347 \text{ нм}$, в то время как максимум поглощения чистого Н33258 соответствует 343 нм . На основании спектров флуоресценции и абсорбции получены кривые связывания в координатах Скетчарда, которые приведены на рис. 2. Как видно из рисунка,

кривая связывания 1, полученная на основании спектров поглощения, нелинейна. Известно, что нелинейность кривых связывания низкомолекулярных веществ с макромолекулами указывает на то, что или имеет место антикооперативное взаимодействие, или же лиганд связывается более чем одним способом [14]. В работах [15, 16] показано, что Н33258 с ДНК взаимодействует по крайней мере двумя способами: сильным специфическим (с АТ-последовательностями) и слабым электростатическим (с фосфатными группами ДНК). Полученную кривую связывания мы анализировали, исходя из существования этих двух способов взаимодействия. Кривая же связывания 2, полученная из анализа спектров флуоресценции, линейна и практически совпадает с прямолинейным участком кривой 1. Прямолинейность полученной флуориметрическим методом кривой связывания Н33258 с ДНК указывает на то, что в

данном случае регистрируется только один способ связывания. Исходя из того, что флуоресцируют только те молекулы связанного лиганда, которые

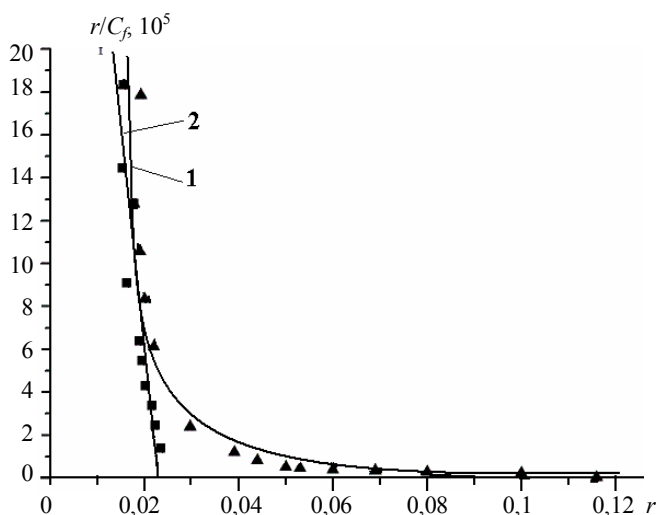


Рис. 2. Кривые связывания Н33258 с ДНК в координатах Скетчарда, полученные из анализа спектров поглощения (1) и флуоресценции (2).

экранированы от молекул воды молекулами ДНК, можно полагать, что флуоресценция молекул лиганда, связанных с фосфатными группами ДНК, тушится молекулами растворителя.

Из кривых адсорбции получены значения параметров K и n , которые обобщены в таблице. Из полученных данных видно, что значения K^s , полученные на основании результатов флуориметрических и абсорбционных исследований, мало отличаются друг от друга, а значение константы связывания Н33258 с ДНК слабым способом почти на два порядка меньше, чем константа связывания сильным способом. Значения n , полученные из анализа абсорбционных и флуориметрических данных, указывают на то, что число мест связывания сильным способом более ограничено, чем для слабого способа.

Экспериментальные значения параметров связывания K и n , полученные для комплексов Н33258 с ДНК при $\mu=0,02 M [Na^+]$, $t=25^{\circ}C$, $pH 7,0$.

| K_{ϕ}^s | K_{abc}^s | K_{abc}^w | n_{ϕ}^s | n_{abc}^s | n_{abc}^w |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|-------------|-------------|
| $4,0 \cdot 10^8 M^{-1}$ | $1,0 \cdot 10^8 M^{-1}$ | $0,01 \cdot 10^8 M^{-1}$ | 25 | 17 | 4 |

Примечание. Индексы s и w указывают на сильный и слабый способы связывания, а ϕ и abc – на параметры, полученные флуоресцентным и абсорбционным методами соответственно.

Таким образом, из спектроскопических исследований выявлено, что Н33258 с ДНК образует два типа комплексов. Один из них является сильным и характеризуется высокой интенсивностью флуоресценции и высокими значениями K ($\geq 4 \cdot 10^8 M^{-1}$) и n (≥ 17). Такой тип связывания соответствует специфическому взаимодействию лиганда с АТ-богатыми участками ДНК [5, 6, 11, 16]. Однако необходимо отметить, что не все АТ-последовательности являются местами связывания, так как показано, что константа связывания Н33258 с $poly[d(A-T)_2]$ меньше, чем с ДНК [7]. С другой стороны, известно, что Н33258 предпочтительнее связывается с $d(GGTAATTACC)$ -последовательностями [11]. На основании этого можно заключить, что большое значе-

ние n обусловлено ограниченностью специфических участков связывания для молекул H33258 на ДНК. Второй способ взаимодействия является более слабым ($K \sim 10^6 M^{-1}$), комплекс не флуоресцирует (по всей вероятности из-за тушения) и обнаруживается только абсорбционным методом. Этот способ имеет электростатическую природу и проявляется при высоких значениях соотношения лиганд/ДНК (см. [15]).

Кафедра биофизики

Поступила 15.02.2007

ЛИТЕРАТУРА

1. **Chaires J.B.** – Biopolymers, 1998, v. 44, p. 201–215.
2. **Gorner H.** – Photochemistry and Photobiology, 2001, v. 73, № 4, p. 339–348.
3. **Breusegem S.Y., Sadat-Ebrahimi S.E., Douglas K.T., Bichenkova E.V., Clegg R.M., Loontjens F.G.** – J. Med. Chem., 2001, v. 44, № 16, p. 2503–2506.
4. **Tanious F.A., Hamelberg D., Bailly Ch., Czarny A., Boykin D.W., Wilson W.D.** – J. Am. Chem. Soc., 2004, v. 126, № 1, p. 143–153.
5. **Ismail M.A., Rodger P.M., Rodger A.** – J. Biomolec. Struct. & Dyn., Conversation 11, Proceedings of the Eleventh Conversation, University at Albany, SUNY, June 15–19, 1999, Adenine Press, 2000, p. 335–348.
6. **Bunkenborg J., Behrens C., Jacobsen J.P.** – Bioconjugate Chem., 2002, v. 13, № 5, p. 927–936.
7. **Breusegem S.Y., Loontjens F.G., Regenfuss P., Clegg R.M.** – Biophysical approaches, 2001, v. 340, p. 212–233.
8. **Reddy P.M., Bruice Th.C.** – J. Am. Chem. Soc., 2004, v. 126, p. 3736–3747.
9. **Pal S.K., Zhao L., Zewail A.H.** – Natl. Acad. Sci. USA, 2003, v. 100, № 14, p. 8113–8118.
10. **Han F., Taulier N., Chalikian T.V.** – J. Biochemistry, 2005, v. 44, p. 9785–9794.
11. **Bostock-Smith C.E., Laughton Ch.A., Searle M.S.** – J. Biochemistry, 1999, v. 342, p. 125–132.
12. **Kakkar R., Grover S.R.** – J. Biomolec. Struct. & Dyn., 2005, v. 23, p. 37–47.
13. **Tawar U., Jain A.K., Chandra R., Singh Y., Dwarakanath B.S., Chaudhury N.K., Good L., Tandon V.** – J. Biochemistry, 2003, v. 42, № 45, p. 13339–13346.
14. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T.** – Experimental and Molecular Medicine, 2003, v. 35, № 6, p. 527–533.
15. **Germann M.W., Kalisch B.W., van de Sande J.H.** – J. Biomol. Struct. & Dyn., 1996, v. 13, № 6, p. 953–962.
16. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Pirumyan K.V., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T.** – Proceedings of 14th Conversation on Biomolecule Structure and Dynamics, 2005, Albany, J. Biomol.Struct.Dyn., p. 860.

Ա. Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Զ. Վ. ՓԻՐՈՒՄՅԱՆ, Մ. Ս. ՄԻՔԱԵԼՅԱՆ, Պ. Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ

ԳՆԹ-Ի ՀԵՏ Hoechst 33258-Ի ԿԱՊՄԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո մ

Սպեկտրոսկոպիկ (ֆլուորեսցենտային և արտրոբցիոն) մեթոդներով հետազոտված է Hoechst 33258 միացության փոխազդեցությունը ԳՆԹ-ի հետ: Հայտնաբերված է, որ այդ լիզանդը ԳՆԹ-ի հետ կապվում է երկու եղանակ-

ներով՝ ուժեղ և թույլ: ԴՆԹ-ի հետ Hoechst 33258 միացության ուժեղ եղանակով կապումը հայտնաբերվում է ինչպես ֆլուորեսցենտային, այնպես էլ արտաբացիոն մեթոդներով, մինչդեռ թույլ եղանակը հայտնաբերվում է միայն արտաբացիոն մեթոդով: Սպեկտրոսկոպիկ տվյալների վերլուծության հիման վրա հաշվարկված են կապման պարամետրերի՝ K -ի և n -ի արժեքները:

A. P. ANTONYAN, K. V. PIRUMYAN, M. S. MIKAELYAN, P. O. VARDEVANYAN

RESEARCH OF Hoechst 33258 BINDING WITH DNA

Summary

Research of interaction of Hoechst 33258 with DNA, binding through a minor groove of DNA, by spectroscopic (fluorescent and absorption) methods is carried out. It is revealed, that this ligand with DNA binds by two modes – strong and weak. The strong type of interaction Hoechst 33258 with DNA is detected by both fluorescent and absorption methods, while the weak type is observed only by the absorption method. On the basis of the analysis of the spectroscopic data values of parameters of linkage - K and n are calculated.