

*Биология*

УДК 577.113.6

К. В. ПИРУМЯН

### ЗАВИСИМОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ И Hoechst 33258 С ДНК ОТ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА

Проведено плавление комплексов ДНК с бромистым этидием (БЭ) и Hoechst 33258 при ионных силах раствора  $\mu=2\cdot 10^{-3}$  и  $\mu=2\cdot 10^{-2}$  М Na<sup>+</sup>. Выявлено, что специфичность Hoechst 33258 к АТ-последовательностям ДНК проявляется при ионной силе  $\mu=2\cdot 10^{-2}$  М Na<sup>+</sup>, в то время как уменьшение ионной силы раствора на порядок приводит к исчезновению специфичности. Показано также, что БЭ в этих же условиях специфичность к определенным последовательностям не проявляет.

**Введение.** В последнее время интенсивно изучается нековалентное обратимое связывание низкомолекулярных веществ (лигандов) с ДНК, поскольку большинство из них обладает терапевтическим действием [1, 2]. Изучение связывания различных лигандов с ДНК важно и для выяснения особенностей биологической активности ДНК, для понимания механизмов контроля генной экспрессии. Необходимо отметить, что лиганды, связывающиеся с ДНК различными механизмами (интеркаляционным, внешним или электростатическим), могут проявлять специфичность к определенным последовательностям или участкам ДНК [1, 2]. Так, Hoechst 33258 (H33258) связывается внешне в малом желобке ДНК и проявляет ярко выраженную специфичность к АТ-последовательностям [3], бромистый этидий (БЭ) интеркалирует в плоскости пар оснований, предпочитая пиримидин-пуриновые последовательности [4].

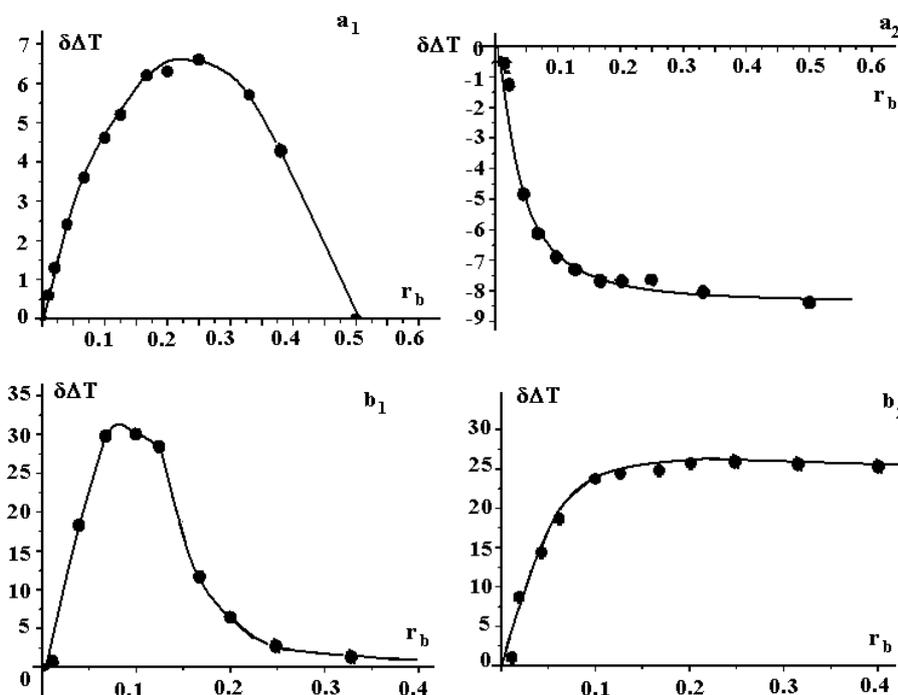
Интерес к БЭ обусловлен тем, что он не только является красителем ДНК и сильным мутагеном, но и проявляет антибактериальное воздействие. В ряде исследований последних лет показано, что БЭ с ДНК взаимодействует несколькими способами в зависимости как от его концентрации, так и от условий среды [5–7]. Интерес же к H33258 обусловлен тем, что этот лиганд используется как флуоресцентный краситель ДНК и хромосом [8]. При этом выявлено, что он легко проникает через клеточную мембрану, проявляя антигельминтное и противоопухолевое свойства [9, 10].

Несмотря на многочисленность высокоразрешающих структурных исследований комплексов ДНК с различными лигандами, они дают только статическую картину конечного состояния комплекса, в то время как условия

образования этих комплексов, а также факторы, влияющие на их стабилизацию, остаются в стороне (см. [2]). Исходя из вышеприведенного, в данной работе проведено сравнительное исследование взаимодействия БЭ и Н33258 с ДНК в зависимости от ионной силы раствора.

**Результаты экспериментов.** Исследования комплексов ДНК с указанными лигандами проведены методом термического плавления, как указано в работах [5, 8].

На рисунке приведены кривые зависимости изменения ширины интервала плавления  $\delta\Delta T$  комплексов БЭ и Н33258 с ДНК от  $r_b$  ( $r_b = [\text{лиганд}]/[\text{ДНК}]$ ) при ионных силах  $\mu = 2 \cdot 10^{-2} M \text{ Na}^+$  ( $a_1$  и  $a_2$  соответственно) и  $\mu = 2 \cdot 10^{-3} M \text{ Na}^+$  ( $b_1$  и  $b_2$  соответственно).



Кривые зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r_b$  комплексов БЭ и Н33258 с ДНК при ионных силах  $\mu = 2 \cdot 10^{-2} M \text{ Na}^+$  ( $a_1$  и  $a_2$  соответственно) и  $\mu = 2 \cdot 10^{-3} M \text{ Na}^+$  ( $b_1$  и  $b_2$  соответственно).

Как видно из приведенного рисунка, в случае БЭ ход кривых зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r_b$  одинаков при указанных ионных силах раствора ( $a_1$  и  $b_1$ ), в то время как в случае Н33258 эти кривые радикально отличаются друг от друга ( $a_2$  и  $b_2$ ). В случае БЭ основным способом связывания является интеркаляция, которая практически не зависит от ионной силы раствора [1], вследствие чего поведение  $\delta\Delta T$  не меняется при изменении ионной силы раствора. В случае Н33258 имеет место ярко выраженная специфичность к АТ-последовательностям ДНК при  $\mu = 2 \cdot 10^{-2} M \text{ Na}^+$ , вследствие чего  $\delta\Delta T$  отрицательное. При уменьшении ионной силы раствора на порядок специфичность молекул Н33258 к АТ-последовательностям ДНК исчезает и зависимость  $\delta\Delta T$  от  $r_b$  становится положительной. Известно, что специфичность молекул Н33258 к

АТ-последовательностям в малом желобке ДНК обусловлена как гидрофобностью, так и высоким электроотрицательным потенциалом этих участков [2]. Поскольку при низких ионных силах раствора степень гидратированности ДНК больше, то, по всей вероятности, для гидрофобных молекул этого лиганда предпочтительной становится интеркаляция в плоскости пар оснований, за счет чего они экранируются от молекул воды, входящих в гидратную оболочку ДНК. Такая возможность допускается также авторами работы [11]. Отсюда можно полагать, что в процессе плавления комплексов имеет место перераспределение молекул лиганда с денатурированных на еще неденатурированные участки, как в случае БЭ [5], что приводит к увеличению  $\delta\Delta T$  при повышении концентрации лиганда.

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что ионная сила раствора является определяющей при связывании H33258 с ДНК, в то время как на особенности взаимодействия БЭ с ДНК она практически не влияет.

Кафедра биофизики

Поступила 12.11.2007

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lane A.N., Jenkins T.C. – Quarterly Reviews of Biophysics, 2000, v. 33, № 3, p. 255–306.
2. Chaires J.B. – Current Opinion in Structural Biology, 1998, v. 8, p. 314–320.
3. Parkinson J.A., Barber J., Douglas K.T., Rosamond J., Sharples D. – Biochemistry, 1990, v. 29, p. 10181–10190.
4. Cantor C.R., Schimmel P.R. Biophysical Chemistry. Book 3. New York: W.H. Freeman and company, 1980, 1371 p.
5. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. – Experimental and Molecular Medicine, 2001, v. 33, № 4, p. 205–208.
6. 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.
7. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. – Молекулярная биология, 1997, т. 31, № 2, с. 263–273.
8. Germann M.W., Kalisch B.W., van de Sande J.H. – J. Biomol. Struct. & Dynam., 1996, v.13, № 6, p. 953–962.
9. Denham D.A., Suswillo R.R., Rogers R., McGreevy P.B., Andrew B.J. – J. Helminthol, 1976, v. 50, p. 243–250.
10. Bostock-Smith C.E., Laughton C.A., Searle M.S. – Biochem. J., 1999, v. 342, p. 125–132.
11. Wellenzohn B., Flader W., Wingert R.H., Hallbrucker A., Mayer E., Liedl K.R. – Biophys. J., 2001, v. 81, № 3, p. 1588–1599.

#### Ք. Վ. ՓԻՐՈՒՄՅԱՆ

ԳՆԹ-ի ՀԵՏ ԷԹԻԳԻՈՒՄԻ ԲՐՈՍԻԴԻ ԵՎ Hoechst 33258-ի ՄԻԱՑՄԱՆ  
ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼՈՒԾՈՒՅԹԻ ԻՈՆԱԿԱՆ ՈՒՇԻՑ

#### Ամփոփում

Կատարվել է ԳՆԹ-ի հետ էթիդիումի բրոմիդի (ԷԲ) և Hoechst 33258-ի միացությունների կոմպլեքսների հալում  $\mu=2\cdot 10^{-3}$  և  $\mu=2\cdot 10^{-2}$  M Na<sup>+</sup> իոնակամ

ուժերով լուծույթներում: Բացահայտվել է, որ Hoechst 33258 միացության սպեցիֆիկությունը ԳՆԹ-ի AT-հաջորդականությունների նկատմամբ դրսևորվում է  $\mu=2 \cdot 10^{-2} M Na^+$  իոնական ուժի դեպքում, մինչդեռ լուծույթի իոնական ուժի փոքրացումը մեկ կարգով հանգեցնում է սպեցիֆիկության անհետացմանը: Ցույց է տրված նաև, որ ԷԲ-ն այդ նույն պայմաններում որոշակի հաջորդականությունների նկատմամբ սպեցիֆիկություն չի դրսևորում:

K. V. PIRUMYAN

DEPENDENCE OF EtBR AND Hoechst 33258 BINDING WITH DNA  
ON IONIC STRENGTH OF SOLUTION

Summary

Melting of DNA and its complexes with ethidium bromide (EtBr) and Hoechst 33258 has been carried out at  $\mu=2 \cdot 10^{-3}$  and  $\mu=2 \cdot 10^{-2} M Na^+$  ionic strength of solution. It is revealed, that specificity of Hoechst 33258 to the AT sequences is observed at  $\mu=2 \cdot 10^{-2} M Na^+$  ionic strength, whereas decreasing of ionic strength in one order leads to disappearance of specificity. It is shown that EtBr doesn't show specificity to the obtained sequences in the same conditions.