

*Биология*

УДК 577.113.6

Р. А. КАРАПЕТЯН

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА НА ОСОБЕННОСТИ  
СОВМЕСТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ И  
НОЕCHST 33258 С ДНК

Экспериментально показано, что при совместном взаимодействии бромистого этидия (БЭ) и Hoechst 33258 с ДНК в зависимости от их концентраций наблюдается превалирующее воздействие одного из этих лигандов на параметры плавления образующихся комплексов. При ионной силе раствора  $0,02 \text{ M Na}^+$  и низких концентрациях лигандов ( $r < 0,05$ ) более выраженным становится воздействие БЭ, а при сравнительно высоких концентрациях значительно усиливается воздействие Н33258. При ионной силе раствора  $0,002 \text{ M Na}^+$  оба лиганда одинаково влияют на параметры плавления ДНК.

**Введение.** Взаимодействие биологически активных соединений с ДНК интенсивно изучается для определения специфичности их связывания с определенными участками ДНК, выявления особенностей механизмов этих взаимодействий и для понимания влияния лигандов на функционирование ДНК [1–4]. Известные в настоящее время лиганды, нековалентно связывающиеся с ДНК, подразделяются в основном на два больших класса: лиганды, специфичные к определенным последовательностям ДНК, связывающиеся с ней через одну из ее бороздок, не нарушая двухцепочечные структуры [5, 6]; интеркаляторы, вклинивающиеся в плоскость пар оснований ДНК, при этом структура ДНК в участках интеркаляции претерпевает определенные изменения [7].

Исследования последних лет выявили мультимодальность большинства лигандов, что нельзя не учитывать при выяснении особенностей их взаимодействия с ДНК. С этой точки зрения важно и моделирование комплексообразования лигандов с различными структурами ДНК на основании данных, полученных при изучении классических лигандов, которые могут связываться с ДНК несколькими способами. Таковыми являются бромистый этидий (БЭ), который, как показывают исследования, может связываться с ДНК различными механизмами (интеркаляционным, электростатическим и др.), и Hoechst 33258 (Н33258), связывающийся через малую бороздку ДНК [8–14].

БЭ является классическим интеркалятором, т.е. связывается с ДНК путем вклинивания между соседними парами оснований спирали с пред-

почтением к пурин-пиримидиновому чередованию [8–10]. Н33258 – “внешне” связывающееся с ДНК соединение, специфичное к участкам двойной спирали полинуклеотида, которые содержат три последовательно расположенных АТ- и одну GC-пары оснований [11, 12].

Вследствие различного характера связывания и специфичности БЭ и Н33258 к последовательностям оснований ДНК совместное использование этих лигандов может существенно повысить информативность исследований их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, а также даст возможность синтезировать новые биологически активные соединения с более высокой чувствительностью и специфичностью к субстрату.

Данная работа посвящена экспериментальному исследованию влияния ионной силы раствора на особенности совместного взаимодействия БЭ и Н33258 с ДНК в зависимости от соотношения лигандов и ДНК.

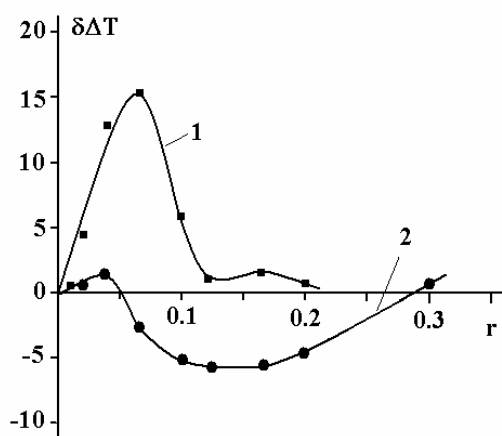
**Экспериментальная часть.** В работе были использованы ДНК тимуса теленка (сверхчистая, любезно предоставленная проф. Д. Ю. Ландо), БЭ и Н33258 фирмы “Serva” (Германия), NaCl, Na-цитрат (ос. ч.). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Образцы препаратов готовились в стандартном солевом цитратном (SSC) растворе, содержащем  $10^{-5}$  M этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) с ионными силами  $\mu=0,002$  и  $0,02$  M Na<sup>+</sup>. SSC готовили, используя бидистиллированную воду. Концентрации ДНК и лигандов определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции:  $\varepsilon_{260}=6600$  M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для ДНК,  $\varepsilon_{480}=5850$  M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для БЭ и  $\varepsilon_{343}=42000$  M<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для Н33258. Соответствующие комплексы ДНК с лигандами получали смешиванием растворов ДНК с БЭ и Н33258 в соответствующих пропорциях: соотношение концентраций лиганд/ДНК ( $r$ ) изменялось в интервале  $0 < r \leq 0,3$  при ионной силе раствора  $0,02$  M Na<sup>+</sup> и  $0 < r \leq 0,2$  при ионной силе  $0,002$  M Na<sup>+</sup>.

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами осуществлялось на спектрофотометре PUE UNICAM-SP8-100 (Англия). Кварцевые кюветы (толщиной 1 см с герметически закрытыми тефлоновыми крышками) с растворами помещались в термостатируемые ячейки спектрофотометра и нагревались с постоянной скоростью  $0,25$  град/мин. Данные поглощения образцов выводились на программируемый микрокалькулятор Hewlett Packard 97S I/O (США). Измерения каждого образца проводились с 5-кратным повтором, после чего данные усреднялись. Экспериментальная ошибка не превышала 10–15%.

Зависимости изменения ширины интервала плавления получали способом, описанным в [9].

**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами экспериментально получено, что при ионной силе  $0,02$  M Na<sup>+</sup> зависимость изменения ширины интервала плавления ( $\delta\Delta T$ ) комплексов БЭ с ДНК от концентрации лиганда имеет колоколообразную форму [8, 9], а в случае Н33258  $\delta\Delta T$ , принимая отрицательные значения, убывает и со значения  $r \geq 0,15$  стремится к постоянной величине [13]. В то же время температура плавления ( $T_m$ ) комплексов ДНК как с БЭ, так и с Н33258, как и ожидалось, монотонно растет во всем интервале изменения  $r$  вследствие стабилизации двухцепочечной (дц) структуры ДНК [8, 9, 13]. Исходя из этого интересно выяснить, как эти же лиганды будут

совместно взаимодействовать с ДНК и влиять на параметры перехода спираль-клубок. На рисунке приведены кривые зависимостей  $\delta\Delta T$  от  $r$  комплексов БЭ–Н33258–ДНК при ионных силах раствора 0,002 и 0,02  $M Na^+$ . Из рисунка видно, что при изменении ионной силы раствора на один порядок кривые качественно отличаются друг от друга. В частности, кривая зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r$  при 0,002  $M Na^+$  имеет колоколообразную форму с положительными значениями экспериментальных точек, в то время как эта же зависимость при 0,02  $M Na^+$ , также имея колоколообразную форму, отрицательна.



Зависимости  $\delta\Delta T$  при ионных силах 0,002 (1) и 0,02 (2)  $M Na^+$  комплексов БЭ–Н33258–ДНК от  $r$ , полученные на основании кривых плавления, рН 6,9.

Аналогичные зависимости, получены для комплексов ДНК–БЭ в [9] и ДНК–Н33258 в [13]. В частности, в [9] показано, что в интервале изменения ионной силы раствора  $0,002 \leq \mu \leq 0,02 M Na^+$  ширина интервала плавления чистой ДНК ( $\Delta T_0$ ) меньше, чем  $\Delta T$  комплексов БЭ с ДНК при малых концентрациях лиганда ( $r < 0,2$ ). Известно, что БЭ практически не проявляет специфичность к определенным основаниям ДНК при интеркаляционном связывании и в процессе плавления его молекулы перераспределяются из денатурированных на еще недеденатурированные участки, вследствие

чего интервал плавления комплексов увеличивается.

В [13] показано, что при взаимодействии Н33258 с ДНК  $\Delta T$  меньше, чем  $\Delta T_0$  при  $\mu=0,02 M Na^+$ , поскольку при этом Н33258 преимущественно связывается с АТ-последовательностями ДНК, что уменьшает разность температур плавления блоков АТ и GC ( $\Delta T=T_{GC}-T_{AT}$ ). В то же время при  $\mu=0,002 M Na^+$  специфичность молекул Н33258 к АТ-последовательностям исчезает, вследствие чего  $\Delta T$  комплексов увеличивается.

Полученные в этой работе данные указывают на то, что при 0,02  $M Na^+$  и низких концентрациях лигандов ( $r < 0,05$ ) зависимость  $\delta\Delta T$  от  $r$  увеличивается вследствие более выраженного влияния БЭ в стабилизации дц-структуры ДНК, чем Н33258. Необходимо отметить, что в этих условиях значения  $\delta\Delta T$  в случае комплексов БЭ–ДНК больше [9], чем для комплексов БЭ–Н33258–ДНК, не смотря на то, что при малых концентрациях места связывания для обоих лигандов на ДНК практически независимы друг от друга. Тем не менее мы полагаем, что Н33258 сильно затрудняет связывание БЭ с ДНК. Увеличение концентрации лигандов в комплексе БЭ–Н33258–ДНК приводит к уменьшению значений  $\delta\Delta T$  (см. рисунок), поскольку усиливается влияние Н33258 на термостабильность АТ-богатых участков и, по всей вероятности, имеет место подавление молекулами Н33258 влияния БЭ на параметры плавления ДНК. При более высоких концентрациях лигандов Н33258 блокирует места связывания и перераспределение молекул БЭ с денатурированными на

неденатурированные участки ДНК затрудняется. Вследствие этого молекулы БЭ начинают дестабилизировать дц-структуру ДНК. В работах [8, 9] также показано, что при концентрациях БЭ  $r \sim 0,2$   $\delta\Delta T$  комплексов БЭ–ДНК уменьшается, а при более высоких значениях  $r$  ( $>0,2$ ) интервал плавления резко возрастает. Из рисунка видно, что в указанном интервале изменений концентраций лигандов  $\delta\Delta T$  комплексов ДНК–БЭ–Н33258 также увеличивается, тогда как в случае Н33258 она не меняется (см. [13]). Следовательно, можно полагать, что при больших концентрациях указанных лигандов ярко выражено влияние БЭ, поскольку в этих условиях Н33258 практически не связывается с ДНК.

Кривая же зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r$  комплексов БЭ–Н33258–ДНК, полученная при ионной силе раствора  $0,002 M Na^+$ , практически совпадает с аналогичной кривой для комплексов БЭ–ДНК (см. [9]). Тогда как зависимость  $\delta\Delta T$  от  $r$  комплексов ДНК–Н33258 увеличивается при низких и достигает насыщения при относительно больших концентрациях лиганда [13]. На основании литературных и полученных нами экспериментальных данных мы полагаем, что при низких ионных силах оба лиганда практически одинаково влияют на параметры плавления ДНК.

Таким образом, совместное влияние БЭ и Н33258 на плавление ДНК не является простой суммой их отдельных влияний.

*Кафедра биофизики*

*Поступила 03.11.2009*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Denison L., Haigh A., D'Cunha G. and Martin R.F.** Int. J. Radiat. Biol., 1992, v. 61, p. 69–81.
2. **Gazzard B.G.** J. Antimicrob. Chemother., 1989, v. 23, p. 67–75.
3. **Osashi M. and Oki T.** Expert. Opin. Therp. Patents., 1996, v. 6, p.1285–1294.
4. **Bartulewicz D., Markowska A., Wolczynski S., Dabrowska M. and Rozanski A.** Acta Biochim. Polonica, 2000, v. 47, p. 23–35.
5. **Eriksson S., Kim S.K., Kubista M. and Norden B.** Biochemistry, 1993, v. 32, p. 2987–2998.
6. **Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д.** Биоорган. химия, 2001, v. 27, с. 64–73.
7. **Tomosaka H., Omata S., Hasegawa E. and Anzai K.** Biosci. Biotech. Biochem., 1997, v. 61, p. 1121–1125.
8. **Karapetian A.T, Mehrabian N.M, Terzikian G.A, Vardevanian P.O., Antonyan A.P., Borisova O.E., Frank-Kamenetskii M.D.** J. Biomol. Struct. Dyn., 1996, № 14, p. 275–283.
9. **Vardevanyan P. O., Antonyan A. P., Manukyan G. A., Karapetian A. T.** Experimental and Molecular Medicine, 2001, № 33, p. 205–208.
10. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T.** Experimental and Molecular Medicine, 2003, № 35, p. 527–533.
11. **Neidle S.** Nat. Prod., 2001, v. 18, p. 291–309.
12. **Wemmer D.E.** Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2000, v. 29, p. 439–461.
13. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Pirumyan K.V., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T.** J. Biomol. Struct. Dyn., 2005, v. 22, № 6, p. 860–861.
14. **Борисова О.Ф., Щелкина А.К., Карапетян А.Т., Суровая А.Н.** Молекулярная биология, 1998, т. 32, № 5, с. 855–862.

Ռ. Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԻՈՆԱԿԱՆ ՈՒԺԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳՆԹ-Ի ՀԵՏ ԷԹԻԳԻՈՒՄԻ  
ԲՐՈՄԻԴԻ ԵՎ HOECHST 33258-Ի ՀԱՄԱՏԵՂ ԿԱՊՄԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Փորձարարական եղանակով ցույց է տրված, որ ԳՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և Hoechst 33258-ի համատեղ փոխազդեցության դեպքում լիգանդների կոնցենտրացիայից կախված դիտվում է դրանցից մեկի գերակշռող ազդեցությունը ստացված կոմպլեքսի հալման պարամետրերի վրա: Լուծույթի  $0,02 M Na^+$  իոնական ուժի և լիգանդների փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ( $r < 0,05$ ) ավելի արտահայտված է ԷԲ-ի ազդեցությունը, համեմատաբար մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում զգալիորեն ուժեղանում է Hoechst 33258-ի ազդեցությունը: Լուծույթի  $0,002 M Na^+$  իոնական ուժի դեպքում երկու լիգանդներն էլ միանման են ազդում ԳՆԹ-ի հալման պարամետրերի վրա:

R. A. KARAPETYAN

INFLUENCE OF IONIC STRENGTH OF SOLUTION ON EtBr AND  
HOECHST 33258 JOINT BINDING PECULIARITIES WITH DNA

Summary

For the first time it is experimentally shown, that at joint interaction of EtBr and Hoechst 33258 with DNA depending on their concentration the prevailing influence of one of them on melting parameters of their complexes with biopolymer is observed at ionic strength of solution  $0,02 M Na^+$ : at small concentration of ligands ( $r < 0,05$ ) the influence of EtBr is more expressed. At the rather large concentration influence of H33258 considerably amplifies. At ionic strength of solution  $0,002 M Na^+$  the two ligands influence on DNA melting parameters in the same way.