Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•*Փորձարարական և տեսական հոդվածներ*• *Экспериментальные и теоретические статьи*•
•*Experimental and Theoretical articles*•

Биолог. журн. Армении, 2 (61), 2009

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ EtBr И HOECHST 33258 С ДНК РАЗЛИЧНОГО GC-СОДЕРЖАНИЯ

П.О. ВАРДЕВАНЯН, А.П. АНТОНЯН, М.А. ПАРСАДАНЯН, Р.А. КАРАПЕТЯН, М.А. ШАГИНЯН

Ереванский государственный университет, биологический факультет, кафедра биофизики E-mail: biophys_dep@mail.ru

Показано, что бромистый этидий (EtBr) и Hoechst 33258 (H33258) связываются с ДНК двумя способами: при низкой ионной силе раствора оба лиганда интеркалируют между плоскостями оснований. Дальнейшее увеличение концентрации лигандов в дополнение к интеркаляции приводит к электростатическому взаимодействию. Увеличение ионной силы раствора не влияет на особенности взаимодействия EtBr с ДНК, в то время как в случае H33258 имеет место качественное изменение способа связывания и проявляется ярко выраженная специфичность этого лиганда к AT-последовательностям полинуклеотида.

Бромистый этидий (EtBr) - Hoechst 33258 (H33258) – ДНК - интеркаляционное взаимодействие

Ցույց է տրվել, որ էթիդիումի բրոմիդը (ԷԲ) և (H33258)-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում են երկու եղանակներով: Ցածր իոնական ուժով լուծույթներում երկու լիգանդներն էլ կապվում են ինտերկալյացիոն մեխանիզմով (ներդրվում են հիմքերի հարթությունների միջև): Լիգանդների կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց ինտերկալյացիայի հետ համատեղ ի հայտ է գալիս ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների էլեկտրաստատիկ մեխանիզմով փոխազդեցությունը:

Լուծույթի իոնական ուժի մեծացումը չի ազդում ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունների վրա, մինչդեռ (H33258)-ի դեպքում ԴՆԹ-ի հետ կապման մեխանիզմը որակապես փոխվում է և դրսևորվում է պոլինուկլեոտիդի AT-հաջորդականությունների նկատմամբ Hoechst-ի վառ արտահայտված սպեցիֆիկությունը:

Էթիդիումի բրոմիդ (ԷԲ) - Hoechst 33258 (H33258) - ԴՆԹ - ինտերկալյացիոն փոխազդեցություն

It has been shown that EtBr as well as Hoechst 33258 (H33258) binds to DNA by two modes. At low ionic strength of solution both ligands intercalate between planes of bases.

Further increasing of ligands concentration leads to electrostatic interaction as well. The increase in ionic strength of a solution does not influence features of interaction EtBr with DNA while in case of H33258 qualitative change of a binding way takes place and strongly expressed specificity of this ligand to AT-sequences of polynucleotide is shown.

Ethydium bromide (EtBr) - Hoechst 33258 (H33258) - DNA - intercalating interaction

Изучение конформации ДНК и структурных переходов в ней послужили основой для исследований ее специфического связывания с биологически активными низкомолекулярными веществами - лигандами, без которого не осуществляется ни один важный генетический процесс в клетке. При взаимодействии с ДНК лиганды могут проявлять ярко выраженные биологические и фармакологические свойства, поэтому выявление физико-химических механизмов комплексообразования аналогичных соединений с ДНК важно как для выяснения особенностей различных способов связывания, так и для дальнейшего усовершенствования химического строения и синтеза новых, более эффективно действующих биологически активных веществ на генетический аппарат клетки [1,5,7,8].

Одним из эффективных путей решения этой проблемы представляется использование лигандов, не связанных между собой непосредственно, а имеющих согласованные комплексообразующие свойства. Одной из таких систем может являться сочетание бромистого этидия (EtBr) и Hoechst 33258 (H33258). Эти лиганды нековалентно связываются с ДНК различными способами. Первый из них – классический интеркалятор, второй - неинтеркалятор, внешнесвязывающийся лиганд. EtBr вклинивается между соседними парами оснований, вызывая значительные изменения структурной организации ДНК [4,6,9,10]. H33258 локализуется в малом желобке ДНК, не меняя интегральность структуры последней [2,3,11]. Различия в характере связывания и специфичности этих лигандов позволит в целом, при их совместном использовании, повысить информативность исследований в сфере изучения термодинамики взаимодействия лигандов с ДНК.

Целью настоящей работы явилось термодинамическое исследование связывания EtBr и H33258 с ДНК, результаты которого важны для понимания механизмов комплексообразования при одновременном взаимодействии этих лигандов с полинуклеотидами. Подобные исследования важны и для дальнейшего изучения совместного взаимодействия лигандов с ДНК, что может дать возможность синтезировать новые соединения с более высокой чувствительностью и специфичностью к субстрату.

Материал и методика. **Препараты.** В работе были использованы ДНК тимуса теленка (т.т.) (среднее GC содержание – 42 %), (высокоочищенная, любезно предоставленная проф. Д.Ю. Ландо), ДНК *Clostridium perfringes* (Cl.perf.) (среднее GC содержание – 31 %) и *Micrococcus lysodeicticys* (M.lys.) (среднее GC содержание – 72 %) (Sigma, США), EtBr, H33258 (“Serva” Германия). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК и лигандов определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: ε_{260}=6600 $M^{-1}см^{-1}$ для ДНК т.т., ε_{258}=7400 $M^{-1}см^{-1}$ для ДНК Cl. perf, ε_{260}=6600 $M^{-1}см^{-1}$ для ДНК M. lys., ε_{480}=5600 $M^{-1}см^{-1}$ для EtBr и ε_{343} = 42000 $M^{-1}см^{-1}$ для H33258. Комплексы ДНК с лигандами получали смешением растворов ДНК, EtBr и H33258 в соответствующих пропорциях: соотношение концентраций ДНК и лигандов - r_b (r_b=лиганд/ДНК) изменялось в интервале $0 \leq r_b \leq 0{,}33$.

Приборы. Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами осуществляли на спектрофотометре PYE UNICAM-SP8-100 (Англия). Спектральные измерения проводили в герметически закрытых кварцевых кюветах длиной оптического пути 1 см, которые помещали в термостатируемые ячейки спектрофотометра и нагревали со скоростью 0,25 град/мин. Данные поглощения образцов выводили на программируемый микрокалькулятор Hawlett Packard 97S I/O (США). Измерения каждого образца проводили с 5-кратным повтором, после чего данные усредняли. Ошибка экспериментальных результатов не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. Известно, что EtBr и H33258 являются стабилизаторами двухцепочечной (дц-) структуры ДНК [3, 5, 6]. Об этом свидетельствует тот экспериментальный факт, что кривые плавления комплексов ДНК с исследуемыми лигандами смещены в область более высоких температур по сравнению с чистой ДНК. На основании полученных нами кривых плавления комплексов ДНК-EtBr и ДНК-H33258 определяли значения изменения температуры плавления $\delta(1/T_m)=1/T_0-1/T_m$, (где T_0 и T_m температуры плавления чистой ДНК и ее комплексов соответственно) комплексов от r_b при 2mM и 20mM Na^+. На рис. 1 приведены кривые зависимости $\delta(1/Tm)$ от r_b для комплексов т.т.ДНК с EtBr (кр. 1), H33258 (кр. 2) при ионной силе раствора 20mM Na^+.

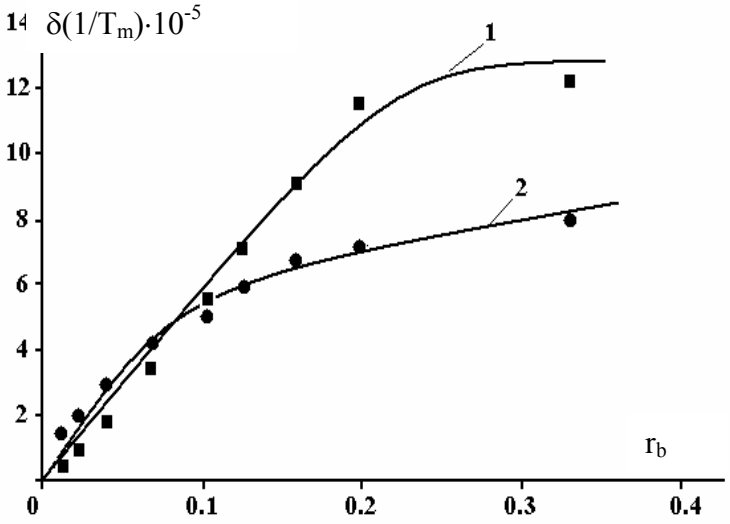

Рис. 1. Зависимости изменения температуры плавления комплексов ДНК тимуса теленка с EtBr (1) и H33258 (2) от r_b при μ=20mM Na^+; pH=6.9. Аналогичные кривые получены для комплексов EtBr и H33258 с ДНК Cl. perf. и M. lys.

Как видно из приведенного рисунка, кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ растут во всем интервале изменения r_b, что обусловлено стабилизирующим влиянием обоих лигандов на двухцепочечную структуру ДНК (аналогичные результаты получены в случае комплексов EtBr с ДНК т.т. при ионной силе раствора 2mM Na^+ и ДНК Cl. perf. и M. lys. с EtBr, H33258, при 2mM Na^+ и 20mM Na^+ (кривые не приведены).

Другой параметр кривых плавления - $\delta(\Delta T/T_m^2)=\Delta T/T_m^2-\Delta_0 T/T_m^2$, (где ΔT и $\Delta_0 T$ ширина интервалов плавления комплексов и чистой ДНК соответственно) комплексов H33258 с ДНК тимуса теленка, Cl. perf. и M. lys. при ионной силе раствора 2mM Na^+ растет монотонно во всем интервале изменения r_b (рис.2, кр. 1,2,3), в то время как аналогичная кривая в случае EtBr имеет колоколообразную форму (рис.2, кр. 4).

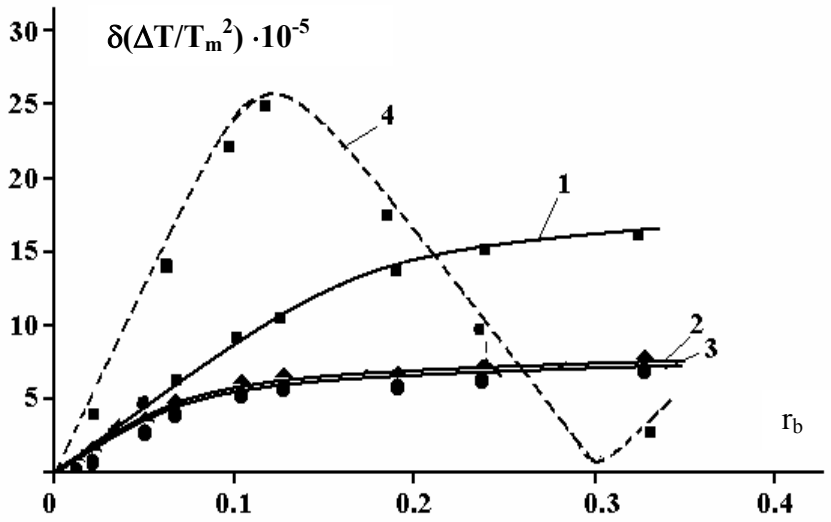

Рис. 2. Зависимости изменения ширины интервала плавления комплексов H33258 с ДНК т.т. (1), Cl. perf. (2) и M. lys. (3) от r_b при ионной силе раствора 2mM Na^+, pH=6.9. Кривая 4 соответствует изменению ширины интервала плавления комплексов ДНК т.т. с EtBr от r_b.

Известно, что колоколообразная форма кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r_b комплексов ДНК-EtBr обусловлена перераспределением молекул лиганда с денатурированных на еще не денатурированные участки ДНК в ходе перехода спираль-клубок, вследствие чего при низких значениях r_b процесс плавления затягивается ($\delta(\Delta T/T_m^2)$ увеличивается) [4]. Из-за ограниченности числа мест связывания для скрепок на дц-ДНК дальнейшее увеличение r_b приводит к затруднению процесса перераспределения, поэтому и ширина интервала плавления комплексов уменьшается. Полученные нами данные показывают, что ход кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r_b комплексов ДНК-EtBr не претерпевает значительных изменений при десятикратном увеличении ионной силы раствора и слабо зависит от GC-содержания ДНК. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с данными спектрофотометрических, гидродинамических, ЯМР исследований, которые показывают, что EtBr вклинивается между плоскостями пар оснований со слабо выраженной предпочтительностью к GC последовательностям ДНК [1]. В случае же H33258 при низких значениях r_b $\delta(\Delta T/T_m^2)$ растет и достигает насыщенности при высоких значениях r_b (рис.2, кривые 1,2,3). Эти данные указывают на то, что EtBr и H33258 по-разному связываются с ДНК.

Экспериментальные исследования показывают, что H33258 предпочтительно связывается в малом желобке B-ДНК с высокой специфичностью к AT - последовательностям, что связано с формой

молекулы лиганда, которая хорошо совпадает с формой малого желобка ДНК [6]. Однако при определенных условиях H33258 с ДНК взаимодействует и интеркаляционным способом [3].

В образовании комплексов H33258 с ДНК, наряду с энтропийным фактором бимолекулярного взаимодействия, существенную роль играют неспецифические электростатические силы [2]. Сопоставление полученных нами данных с литературными приводит к выводу о том, что при низких ионных силах, наряду с интеркаляционным, H33258 с ДНК связывается и электростатическим способом, не проявляя специфичности к определенным парам оснований ДНК [3]. Об этом свидетельствует еще и тот факт, что изменение GC-содержания ДНК существенно не меняет хода кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r_b при ионной силе 2mM Na^+ (рис.2, кр. 1,2,3).

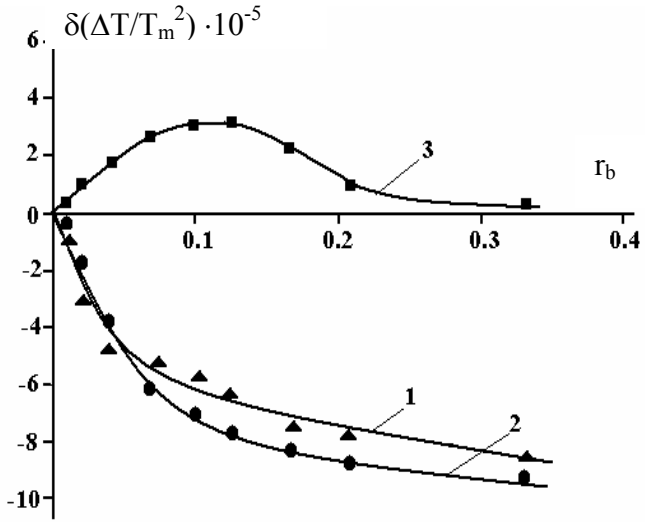

Рис. 3 Зависимости изменения ширины интервала плавления комплексов H33258 с ДНК Cl. perf. (1) и т.т. (2) от r_b при ионной силе раствора 20mM Na^+, pH=6.9. Кривая 3 соответствует изменению ширины интервала плавления комплексов ДНК т.т. с EtBr от r_b.

Увеличение ионной силы на порядок радикально меняет ход кривых зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r_b комплексов ДНК-H33258 (рис.3, кр. 1,2,). Как видно из рис.3 (кр. 1,2), значения величины $\delta(\Delta T/T_m^2)$ в случае комплексов H33258 с ДНК Cl. perf. и т.т. принимают отрицательные значения на всем интервале изменения r_b. Этот факт указывает на предпочтительное связывание H33258 с AT-последовательностями ДНК, вследствие чего разница между температурами плавления AT- и GC-богатых участков (TAT-TGC) уменьшается. Поэтому ширина интервала плавления комплексов уменьшается по сравнению с $\Delta_0 T$ чистой ДНК. В работах [2,10,11] показано, что специфичность H33258 к AT-парам оснований обусловлена большой электроотрицательностью этих последовательностей в малом желобке ДНК и степенью упорядоченности молекул связанной воды. Увеличение ионной силы приводит к увеличению гидратированности AT-последовательностей малого желобка ДНК и

следовательно способствует проявлению специфичности гидрофобного лиганда H33258 к AT-последовательностям.

Таким образом, основываясь на результатах наших экспериментов, можно заключить:

1. EtBr и H33258 связываются с ДНК более чем одним способом: при низкой ионной силе оба лиганда интеркалируют между плоскостями оснований. Дальнейшее увеличение концентрации лигандов приводит в дополнение к интеркаляции к электростатическому взаимодействию их с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК;
2. Увеличение ионной силы раствора не влияет на особенности взаимодействия EtBr с ДНК, в то время как в случае H33258 ярко выражается специфическое связывание этого лиганда с AT-последовательностями полинуклеотида.

В заключении необходимо отметить, что данные перехода спираль-клубок ДНК-лиганд комплексов не могут претендовать на абсолютность какой-либо модели или механизмов комплексообразования, которые в реальности могут быть более сложными, чем мы предполагаем. Однако сопоставление полученных нами данных с результатами исследований флуориметрическим, спектрофотометрическим и другими методами позволило нам установить некоторые важные особенности связывания исследованных лигандов с ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кантор И., Шиммел П.* Биофизическая химия. М., Мир., *3*, с. 370, 1985.
2. *Chaires J.B.* Current Opinion in Struct. Biology, 8, p.314-320, 1998.
3. *Ismail M.A., Roger P.M., Roger A.* J. Biomol, Struct. Dyn. 11, p. 335-348, 2000.
4. *Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D.* J. Biomol. Struct. Dynam., *14*, p.275-283, 1996.
5. Krautbauer R., Pope L.H., Schrader T.E., Allen S., Gaub H.E. FEBS lett., 510,3, p.154-158, 2002.
6. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Quar. Reviews of Biophysics, *33*, 3, p.255-306, 2000.
7. *Sibirtsev V.S.* Biochemistry, *70*, 4, p.449-457, 2005.
8. *Tsuboi M., Benevides J.M., Thomas G.J.jn.* Biophys. J., *92*, 3, p.928-934, 2007.
9. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukian G.A., Karapetian A.T.* Experimental and Molecular Medicine, *33*, 4, p.205-208, 2001.
10. *Vardevanyan P.O.,Antonyan A.P.,Parsadanyan M.A.,Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetyan A.T.*. J. of Biomol. Struct. & Dynam., *22*, 4, p. 465-470, 2005.
11. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T.* Biomol. Struct. Dyn., *25*, 6, p.641-646, 2008.

Поступила 03.03.2009.