



Биол. журн. Армении, 1 (64), 2012

ВЛИЯНИЕ ММ ЭМВ НА СВЯЗЫВАНИЕ НОЕCHST 33258 С ДНК

А.П. АНТОНЯН, М.А. ШАГИНЯН, К.В. ПИРУМЯН,
П.О. ВАРДЕВАНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики
biophys_dep@mail.ru

Проведено исследование влияния электромагнитных волн миллиметрового (ММ ЭМВ) диапазона на комплексобразование Hoechst 33258 (H33258) с ДНК при различных ионных силах раствора. Выявлено, что облучение ММ ЭМВ вызывает увеличение степени гидратации ДНК и существенного изменения структуры системы в целом, что в свою очередь значительно влияет на способы связывания H33258 с ДНК. Экспериментально получено, что облучение водно-солевого раствора ДНК приводит к уменьшению константы связывания H33258 с ДНК по сравнению с необлученным образцом.

*ММ ЭМВ - Hoechst 33258 (H33258) - константа связывания -
координаты Скетчарда*

Հետազոտվել է միլիմետրային տիրույթի էլեկտրամագնիսական ալիքների (ՄՄ ԷՄՎ) ազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ Hoechst 33258-ի (H33258) փոխազդեցության վրա լուծույթի տարբեր իոնական ուժերի դեպքում: Բացահայտվել է, որ ՄՄ ԷՄՎ ճառագայթումը մեծացնում է ԴՆԹ-ի հիդրատացման աստիճանը և հրահրում է ընդհանուր համակարգի կառուցվածքի էական փոփոխություն, ինչն, իր հերթին, զգալիորեն ազդում է ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի կապման եղանակների վրա: Փորձարարականորեն ստացվել է, որ ԴՆԹ-ի ջրա-աղային լուծույթի ճառագայթումը հանգեցնում է ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի կապման հաստատունի նվազմանը չճառագայթահարված նմուշի համեմատ:

*ՄՄ ԷՄՎ — Hoechst 33258 (H33258) — կապման հաստատուն —
Սկետչարդի կոորդինատներ*

The influence of millimeter electromagnetic waves (MM EMW) on interaction of DNA with Hoechst 33258 (H33258) has been investigated at different ionic strengths of solution. It has been revealed that MM EMW irradiation increases DNA hydration degree and induces significant change of whole system structure, which in its turn, apparently effects on binding modes of DNA with H33258. It has been experimentally shown that irradiation of water-saline solution of DNA results in decreasing of binding constant of DNA with H33258 comparing with non irradiated sample.

MM EMW – Hoechst 33258 (H33258) – binding constant – Scatchard's coordinates

В настоящее время значительно возрос интерес к влиянию электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биологические системы. Выявлено, что ММ ЭМВ взаимодействуют с биологическими системами, имеющими разный уровень организации [3-6,8,10,13,14]. Проницаемость этих волн очень низ-

кая, однако влияние, оказываемое на живые организмы, значительное, поскольку миллиметровые волны обладают высокой биологической активностью даже при низких значениях плотности потока энергии. Получается, что ММ ЭМВ диапазона в первую очередь влияет на водное составляющее биологических систем, так как вода является основным компонентом организмов в целом или отдельных органов и тканей [16,17].

Поскольку структурные и функциональные особенности биологических макромолекул связаны со средой, в которой они находятся, ММ ЭМВ в водных средах могут влиять и на молекулярные процессы с участием биологических макромолекул. В частности, степень гидратации ДНК имеет существенное значение при взаимодействии с лигандами, так как одним из факторов, стабилизирующих комплексы, является гидрофобный перенос молекул лиганда из свободного в связанное состояние [7,12,14]. Изменение структуры гидратной оболочки ДНК, вызванное ММ ЭМВ, может играть значительную роль в процессе комплексообразования лигандов с ДНК.

Целью данной работы явилось исследование влияния ММ ЭМВ на термодинамические параметры комплексов ДНК с Н33258 при разных ионных силах раствора.

Материал и методика. Препараты. В работе были использованы ДНК тимуса теленка (т.т.) (среднее GC содержание – 42%), (Sigma, США), Н33258 (Sigma, США). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Маточные концентрации ДНК и Н33258 определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК т.т. и $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Н33258.

Приборы. Облучение проводили в специальном стеклянном сосуде. Толщина облучаемого слоя раствора ≈ 1 мм. Для облучения применялись источники крайне высокочастотных сигналов Г4-141 с областью рабочих частот 37,5-53,5 ГГц и Г4-142 с областью рабочих частот 53,57-78,33 ГГц. Стабильность частоты сигнала генератора составляет $\pm 0.05\%$, а отклонение частоты выходного сигнала в режиме непрерывной генерации не превышает 6 МГц. Облучение образцов проводилось при комнатной температуре, плотность потока мощности в месте нахождения образца при частотах 50,3, 51,8 ГГц составляла 0,6 мВт/см² и при 64,5 ГГц ≈ 50 мкВт/см². Для выявления влияния ММ ЭМВ на комплексообразование ДНК с лигандами водно-солевые растворы с разными ионными силами в течение 60 мин были облучены ММ ЭМВ с частотами 50,3, 51,8 и 64,5 ГГц.

Титрация ДНК с раствором Н33258 осуществлялась на спектрофотометре PYE UNICAM-SP8-100 (Англия). Спектральные измерения проводились в герметически закрытых кварцевых кюветах длиной оптического пути 1 см. Спектры поглощения комплексов были получены в интервале изменения длины волны - $300 \leq \lambda \leq 400$ нм. Максимум поглощения раствора чистого лиганда соответствовал $\lambda=343$ нм, в то время как максимум поглощения полностью связанных с ДНК молекул лиганда соответствовал $\lambda=350$ нм.

Термодинамические параметры связывания (K и n) Н33258 с ДНК были определены из кривых связывания в координатах Скотчарда (зависимость r/C_f от r).

Для получения r/C_f и r из спектров поглощения комплексов Н33258-ДНК определялась концентрация несвязанного лиганда 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 Hoechst 33258 в растворе; $r = C_b/C_p$; C_b – концентрация связанного лиганда, C_p – концентрация нуклеотидов.

Каждое измерение проводилось с 5-кратным повтором, после чего данные усреднялись. Ошибка экспериментальных результатов не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. Для определения параметров связывания лигандов с ДНК под воздействием ММ ЭМВ нами проведено спектрофотометрическое титрование растворов облученной и необлученной ДНК раствором НЗЗ258. Одним из информативных при анализе экспериментальных данных, описывающих связывание малых молекул с макромолекулами, является метод Скетчарда. Для получения кривых связывания в координатах Скетчарда (r/C_f от r , где r – число нуклеотидов ДНК, находящихся в комплексе с молекулами лиганда, C_f – концентрация несвязанных молекул лиганда в растворе), нами были получены спектры абсорбции чистого НЗЗ258 и его комплексов с ДНК (спектры не приводятся).

На рис. 1 приведены кривые связывания НЗЗ258 с ДНК при ионных силах 0.002 (а); 0.005 (б) и 0.02 (в) М Na^+ в координатах Скетчарда, полученные на основании спектров абсорбции. Кр. 1 на приведенном рисунке получены при взаимодействии необлученных образцов, кр. 2 – при взаимодействии облученных с частотой 50,3 ГГц в течение 1 ч образцов (полученные кривые связывания в координатах Скетчарда при других резонансных для воды частотах мало отличались друг от друга и не приведены).

Из рис. видно, что кривые связывания нелинейные. 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 [18]. В работах [9,19] показано, что НЗЗ258 с ДНК взаимодействует по крайней мере двумя способами – сильным (специфически с АТ последовательностями) и слабым (электростатически с фосфатными группами ДНК). Основываясь на это, полученную кривую связывания мы анализировали с точки зрения существования двух способов взаимодействия.

Из изотерм адсорбции получены значения параметров связывания K и n , которые обобщены в табл. 1. Выявлено, что значения K_s и K_s^* , соответствующие сильному способу связывания для необлученных и облученных образцов соответственно, отличаются друг от друга. С другой стороны, величина K_s^* , полученная при ионной силе раствора 0.02 М Na^+ , практически совпадает со значением K_s , полученном при взаимодействии необлученных НЗЗ258 и ДНК при 0.002 М Na^+ .

Известно, что при низких концентрациях соли степень гидратации ДНК больше, при этом молекулы воды образуют высокоупорядоченный водный скелет в малом желобке ДНК в АТ богатых участках (см. [1] и цит.там). С другой стороны, известно, что НЗЗ258 связывается в основном в малом желобке ДНК [15], проявляя специфичность к АТ последовательностям, следовательно, при относительно высокой степени гидратированности ДНК специфичность должна исчезнуть. Подтверждением этого факта являются ранее полученные результаты, обобщенные в работе [19], где показано, что при относительно низких ионных силах – $\mu < 0.004$ М Na^+ НЗЗ258 практически не проявляет специфичность к АТ последовательностям ДНК. Исходя из того, что ключевую роль при связывании НЗЗ258 с ДНК играет гидрофобный перенос молекул лиганда из раствора в связанное состояние в малом желобке ДНК, было заключено, что в этих условиях НЗЗ258 с ДНК взаимодействует интеркаляционным способом [19]. С другой стороны, было показано, что облучение приводит к увеличению степени гидратации ДНК при относительно больших ионных силах раствора ($\mu > 0.005$ М Na^+), в условиях которых специфичность НЗЗ258 к АТ последовательностям исчезает: этот эффект нагляднее проявляется при ионной силе ($\mu \geq 0.01$ М Na^+ [2]. Следовательно, полученные нами данные могут явиться результатом того, что при облучении при $\mu = 0.02$ М Na^+ , вследствие увеличения степени гидратации ДНК, способ связывания НЗЗ258 ана-логичен способу связывания с необлученной ДНК при $\mu = 0.002$ М Na^+ . Этот факт подтверждается также тем, что облучение при $\mu = 0.002$ М Na^+ мало влияет на вели-

чину K_s ($K_s/K_s^* \approx 2$, $\mu=0.002$ М Na^+), поскольку ДНК при этой ионной силе имеет большую степень гидратированности и облучение практически не вызывает значительного увеличения последней.

Высокое же значение K_s , полученное при $\mu=0.02$ М Na^+ , является результатом специфического взаимодействия Н33258 с АТ последовательностями в малом желобке ДНК.

При $\mu=0.005$ М Na^+ значение K_s совпадает с аналогичным значением, полученным при ионной силе раствора 0.002 М Na^+ . Однако обнаружено, что при облучении значение K_s^* уменьшается примерно на порядок. Ранее в работе [19] было показано, что при ионной силе раствора 0.004 М Na^+ Н33258 с ДНК связывается по крайней мере двумя сильными способами – неспецифически (интеркаляция) и специфически (с АТ последовательностями в малом желобке). На основании этого мы полагаем, что полученные нами данные при 0.005 М Na^+ являются результатом одновременного проявления обоих способов, взаимно ослабляющих друг друга.

При интеркаляции в плоскость между парами оснований ДНК одна молекула лиганда связывается примерно с 7-8-ю нуклеотидами ($n_s=7-8$), при специфическом же взаимодействии с АТ богатыми участками одна молекула лиганда связывается с 10-11-ю нуклеотидами ($n_s=10-11$), т.е. места связывания сильным способом ограничены. Поскольку при 0.005 М Na^+ проявляются и интеркаляционный, и АТ специфический способы связывания одновременно, это приводит к тому, что места связывания двумя различными способами перекрываются, что вызывает взаимное ослабление.

На это указывает и тот факт, что значение n_s (n_s – число оснований, приходящих на одно место связывания) намного меньше, чем аналогичная величина, полученная для неспецифического или специфического связывания (табл. 1). По всей вероятности, аналогичный эффект возможен и при $\mu=0.002$ М Na^+ , однако этот эффект незначительный и практически не проявляется при низких ионных силах раствора. Тем не менее, небольшое уменьшение величин K_s^* при облучении (примерно в два раза), полученных при 0.002 М Na^+ , может явиться результатом вышеописанного, так как увеличение числа связанных с ДНК молекул воды происходит за счет их отрыва от ионов Na^+ , вследствие чего плотность положительного заряда этих ионов увеличивается, и это может привести к локальному возрастанию положительного потенциала в определенных участках ДНК. Это в свою очередь, приведет к проявлению АТ специфичности молекул лиганда. В то же время с участками ДНК, находящимися в относительно высокогидратированных состояниях, молекулы лиганда связываются интеркаляционным механизмом, что и приводит к взаимному ослаблению этих двух способов. Однако при ионной силе 0.002 М концентрация ионов Na^+ недостаточна для установления соответствующей структуры ДНК, вследствие чего АТ специфическое связывание Н33258 с ДНК существенно не проявляется.

При 0.02 М Na^+ более предпочтительным остается АТ специфическое связывание в противоположность интеркаляционному, несмотря на то что этот способ также проявляется после облучения.

Из данных табл. 1 видно, что значение константы связывания Н33258 с ДНК слабым способом почти на два порядка меньше, чем константа связывания сильным способом при $\mu \leq 0.002$ М Na^+ и на три порядка при $\mu=0.02$ М Na^+ . При облучении значения K_w^* , полученные при указанных ионных силах, мало отличаются друг от друга, при этом практически совпадают также значения K_w , полученные как для необлученных, так и для облученных препаратов при соответствующих ионных силах. Это указывает на то, что облучение ММ ЭМВ практически не влия-

ет на слабый способ, что может быть результатом того, что молекулы лиганда электростатически связываются с фосфатными группами ДНК.

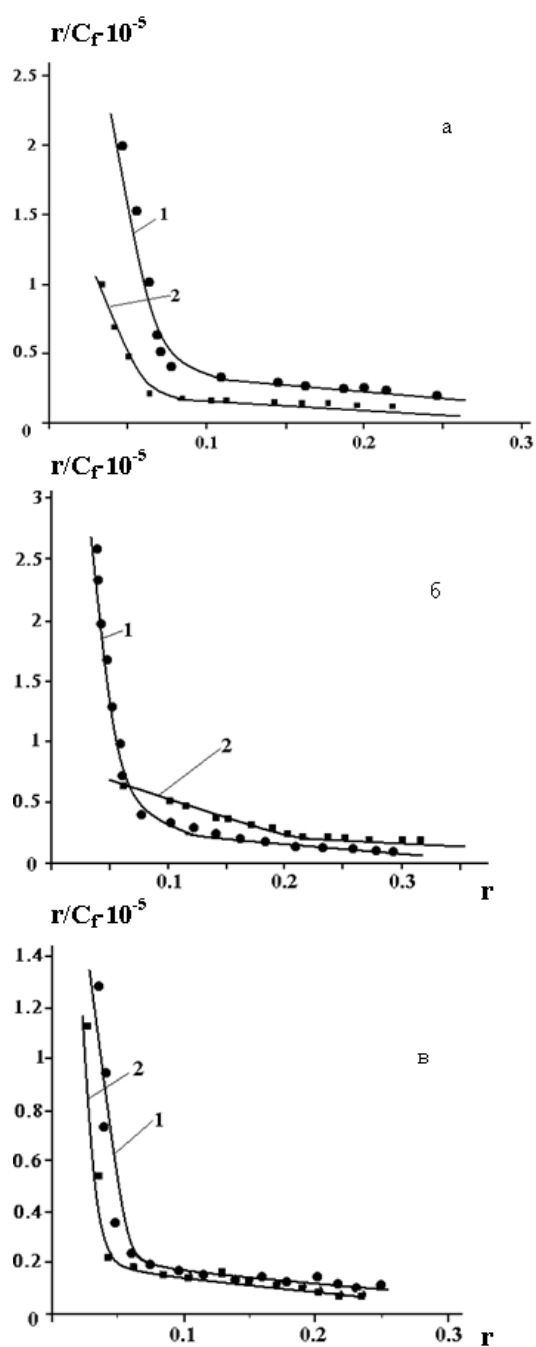


Рис. 1. Кривые связывания H33258 с ДНК в координатах Скетчарда при ионных силах 0.002 (а); 0.005 (б) и 0.02 (в) М Na⁺. Кривые 1 получены для необлученных, кривые 2 - для облученных препаратов.

Таблица 1. Значения констант K и числа мест n связывания необлученных и облученных Н33258 с ДНК

Ионная сила	Необлученные				Облученные			
	$K_s \cdot 10^{-5}$	$K_w \cdot 10^{-5}$	n_s	n_w	$K_s^* \cdot 10^{-5}$	$K_w^* \cdot 10^{-5}$	n_s^*	n_w^*
0.002 M Na^+	60±0.15	0.9±0.05	7.0±1.0	1.5±0.5	30±0.15	0.5±0.05	8.0±1.0	1.5±0.5
0.005 M Na^+	60±0.20	1.4±0.05	8.0±1.0	2.0±0.5	2.6±0.5	0.23±0.15	2.0±1.0	1.0±0.5
0.02 M Na^+	100±0.5	0.45±0.05	10±1.0	2.0±0.5	50±0.2	0.43±0.05	10±1.0	1.5±0.5

Таким образом, из полученных данных выявляется, что Н33258 с ДНК образует два типа комплексов, один из них является сильным и характеризуется высоким значением K ($\approx 10^7$ M⁻¹) и n (≥ 10). Этот тип связывания соответствует специфическому взаимодействию лиганда с АТ богатыми участками ДНК при высоких ионных силах раствора [11,12,19]. При относительно низких ионных силах имеет место уменьшение константы связывания сильным способом ($\approx 10^6$ M⁻¹). Полученные данные также указывают на то, что облучение ММ ЭМВ вызывает увеличение степени гидратации ДНК и существенного изменения структуры системы в целом, что в свою очередь значительно влияет на проявление этого способа связывания Н33258 с ДНК.

Полученные нами данные могут быть полезными при изучении влияния различных биологически активных соединений на функционирование биомакромолекул. Эти данные позволяют также разработать новые подходы для практического применения в биологических системах как низкомолекулярных веществ, так и ММ ЭМВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П. Изучение комплексов ДНК с лигандами различной природы. Биол. журн. Армении, 62, 3, с. 50-58, 2010.
2. Григорян А.В., Антонян А.П., Шагинян М.А., Манукян Г.А., Карапетян А.Т. Влияние нетепловых электромагнитных волн миллиметрового диапазона на комплексы с ДНК. Биол. журн. Армении, 61, 3, с. 57-62, 2009.
3. Девятков Н.Д., Голант М.В., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М., Радио и связь, 168с., 1991.
4. Петросян В.И., Синицын Н.И., Елкин В.А. и др. Роль молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем. Биомедицинская радиоэлектроника, 5-6, с. 62-114, 2001.
5. Смолянская А.З., Гельвич Э.А., Голант М.Б., Махов А.М. Резонансные явления при действии электромагнитных волн миллиметрового диапазона на биологические объекты. Успехи совр. биологии, 87, 3, с. 381-392, 1979.
6. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н. Некоторые новые представления о причине формирования стимулирующих эффектов КВЧ-излучения. Биомедицинская радиоэлектроника, 1, с. 23-33, 2000.
7. Chaires J.B. Energetics of Drug-DNA Interactions. Biopolymers, 44, 3, p. 201-215, 1998.
8. Gandhi O.P. Some basic properties of biological tissues for potential biomedical applications of millimeter waves, 18, 3, p. 295-304, 1983.
9. Germann M. W., Kalisch B. W., van de Sande J.H. Homooligomeric dA.dU and dA.dT sequences in parallel and antiparallel strand orientation: consequence of the 5-methyl groups on stability, structure and interaction with the minor groove binding drug Hoechst 33258. J. Biomol. Struct. & Dyn., 13, 6, p. 953-962, 1996.

10. *Kalantaryan V.P., Vardevanyan P.O., Antonyan A.P. et al.* Influence of Low Intensity Coherent Electromagnetic Millimeter Radiation (EMR) on Aqua Solution of DNA. *Progress in Electromagnetics Research Letters*, 13, p. 1-9, 2010.
11. *Krautbauer R., Pope L.H., Schrader T.E., Allen S., Gaub H.E.* Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy. *FEBS lett.*, 510, 3, p. 154-158, 2002.
12. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 33, 3, p. 255-306, 2000.
13. *Logani M.K., Natarajan M., Makar V.R., Bhanushali A., Ziskin M.C.* Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced NF-kappaB. *Electromagn.Biol Med.*, 25, 1, p. 23-27, 2006.
14. *Nicolas Nicolaz C., Zhadobov M., Desmots F. et al.* Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress. *Cell Biol. Toxicol.*, 25, 5, p. 471-478, 2009.
15. *Parkinson J.A., Barber J., Douglas K., Rosamond J., Sharples D.* Minor groove recognition of the self-complementary duplex d(CGCGAATTCGCG)2 by Hoechst 33258: a high-field NMR study. *Biochemistry*, 29, p. 10181-10190, 1990.
16. *Pathing R.* Dielectric and electronic properties of biological materials. Chichester: John Wiley & Sons, 297p., 1979.
17. *Smith C.W.* Electromagnetic effects in humans. In: Frohlich H. (ed.) *Biological coherence and response to external stimuli*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 205-232, 1988.
18. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T.* The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*, 35, 6, p. 527-533, 2003.
19. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T.* Influence of Ionic Strength on Hoechst 33258 Binding with DNA. *Biomol. Struct. Dyn.*, 25, 6, p. 641-646, 2008.

Поступила 18.01.2012