



комплексов ДНК-лиганд являются важными в контексте совершенствования ДНК-биосенсоров, обнаруживая эффект влияния лигандов на ее термодинамику и кинетику расплетения.

Установлено, что многие лиганды влияют на биологические функции ДНК, поскольку образуют медленно диссоциирующие комплексы с ней. При этом большинство из них могут ингибировать процессы репликации или транскрипции, создавая затруднения для расплетания ДНК [6-8]. Интеркаляторы бромистый этидий (БЭ), акридиновый оранжевый (АО) и др. имеют широкое применение [7-13]. Исследования последних лет указывают на то, что многие лиганды с ДНК могут связываться более чем одним способом, вследствие чего их влияния на ее структуру и функции могут быть противоположными [14,15]. В частности, и БЭ, и АО могут связываться как с двухцепочечной (дц), так и одноцепочечной ДНК и в зависимости от сродства к этим участкам стабилизировать или дестабилизировать ее нативную структуру. В связи с этим особый интерес представляет изучение совместного связывания двух лигандов с ДНК [5,7-13]. Целью настоящей работы стало исследование совместного связывания двух интеркаляторов – БЭ и АО с ДНК.

**Материалы и методы.** В работе были использованы: ДНК тимуса теленка (Sigma, США), АО (Sigma, США), БЭ (Serva, Германия), NaCl, Na-цитрат, ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), химически чистые. Все препараты были использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК, БЭ и АО определялись спектрофотометрически, с использованием следующих коэффициентов поглощения:  $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для ДНК т.т.,  $\epsilon_{420}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для БЭ и  $\epsilon_{490}=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для АО. Исследования проводились при ионной силе раствора  $\mu=0.02 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=7.0$ .

Плавление комплексов ДНК с лигандами, а также спектрофотометрическое измерение поглощения растворов препаратов осуществлялись на спектрофотометре PVE Unicam-SP8-100 (Англия). Нагрев растворов комплексов осуществлялся при помощи программного устройства SP 876 Series 2. Для спектрофотометрических измерений использовали кварцевые кюветы, герметически закрытые тефлоновыми пробками, объемом 3 мл и длиной оптического пути 1 см. Плавление осуществлялось при длине волны  $\lambda=260 \text{ nm}$ , соответствующей поглощению ДНК. Значения поглощений комплексов при плавлении выводились на монитор ПК с помощью программы, разработанной в среде LabView; на их основании построены кривые плавления комплексов (см. [5] и цит. там).

Комплексы ДНК с лигандами готовились с учетом концентрационного соотношения  $r=[C]/[P]$ , где C – концентрация лиганда (БЭ или АО, или совместно БЭ и АО), P – концентрация фосфатных групп ДНК. Значения r менялись в интервале  $0 < r \leq 0.33$ . В случае совместного связывания БЭ и АО с ДНК концентрация каждого лиганда была взята вдвое меньше для обеспечения тождества значений r с этими же значениями, соответствующими комплексам БЭ-ДНК и АО-ДНК.

**Результаты и обсуждение.** Связыванию различных лигандов с ДНК посвящено множество теоретических и экспериментальных работ, в кото-

рых изучены разные аспекты молекулярных механизмов взаимодействия между ними. Основная часть этих исследований относится к связыванию одного лиганда с ДНК, и полученные данные указывают на то, что большинство из изученных лигандов с различными структурами ДНК могут связываться более чем одним способом. Из литературных данных также следует, что проявление того или иного способа связывания лиганда с определенными структурами ДНК зависит от концентрации этих веществ [5, 14-18]. С этой точки зрения определенный интерес представляет исследование взаимодействия двух различных, однако связывающихся одинаковым механизмом лигандов с ДНК. Исходя из этого нами исследована тройная система ДНК-БЭ-АО, поскольку основным способом связывания и БЭ, и АО является интеркаляция. Необходимо отметить, что БЭ является классическим интеркалятором и подходящим объектом для моделирования молекулярных механизмов взаимодействия различных соединений с ДНК, так как для комплексов БЭ-ДНК разработана теоретическая модель структурного перехода спираль – клубок, которая позволяет с помощью зависимости изменения  $T_m$  и  $\Delta T$  от концентрации лиганда рассчитать значение теплоты  $\Delta H^0$  и проводить термодинамический анализ образовавшихся комплексов ДНК с этим лигандом (см. [19]). С помощью этой модели теоретически было обосновано, а в дальнейшем экспериментально показано, что БЭ, а также другие лиганды (МС, Hoechst 33258, актиномицин Д) могут связываться с ДНК несколькими способами. В частности, в случае БЭ обнаруживается три способа связывания с двухцепочечной ДНК – интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический, которые к тому же универсальны и проявляются независимо от ионной силы раствора, рН или других внешних факторов [5, 20, 21]. Этот факт позволяет систему ДНК-БЭ применить в качестве фундамента в исследованиях по взаимодействию различных лигандов с ДНК. В частности, эта модель может стать информативной как для исследований по взаимодействию других интеркаляторов с ДНК, так и для исследований совместного взаимодействия двух лигандов с ней.

Для выяснения особенностей совместного связывания БЭ и АО с ДНК проведено сравнение экспериментальных результатов по взаимодействию одного из этих лигандов в отсутствие другого с ДНК с аналогичными данными, полученными для комплексов ДНК-БЭ-АО. Исследования комплексов ДНК-лиганд осуществлялись методом УФ плавления при ионной силе раствора 0.02 М, получены кривые плавления (кривые не приводятся). Из этих данных определены значения температуры ( $T_m$ ) и ширины интервала плавления ( $\Delta T$ ) ДНК и ее комплексов с лигандами и на их основании определены значения изменений этих параметров –  $\delta(1/T_m)$  и  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$ .

На рис. 1 приведены кривые зависимости  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$ , полученные при ионной силе раствора 0.02 М. Из рисунка видно, что эта зависимость приобретает колоколообразную форму в случае комплексов БЭ-ДНК (кривая 1), поскольку возрастает при низких концентрациях лиганда, затем, достигая своего максимального значения при  $r=0.1$ , с увеличением концентраций БЭ начинает уменьшаться. В случае комплексов АО-ДНК имеет

место возрастание зависимости  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$  при низких концентрациях лиганда ( $0 < r \leq 0.1$ ) (кривая 2). При дальнейшем увеличении концентрации АО эта кривая выходит на плато. Иная ситуация наблюдается в случае совместного связывания БЭ и АО с ДНК (кривая 3), поскольку она, как и кривая 1, колоколообразная. Аналогичная с кривой 1 кривая получается при математическом сложении значений  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  комплексов ДНК-БЭ и ДНК-МС при соответствующих значениях  $r$  (кривая 4).

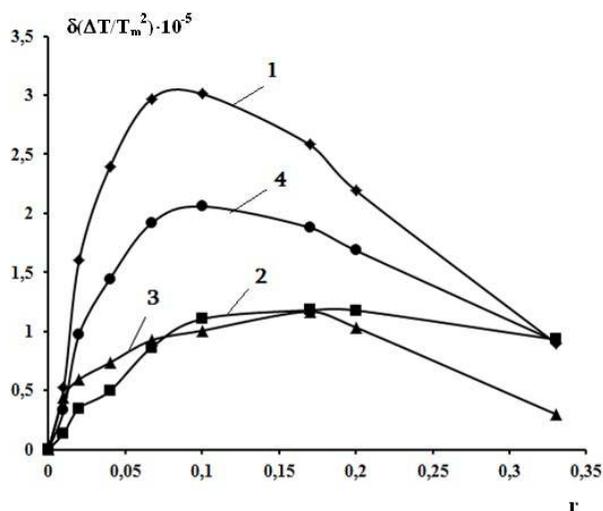


Рис. 1. Кривые зависимости  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$  комплексов БЭ-ДНК (1); АО-ДНК (2), БЭ-ДНК-АО (3) и ДНК-БЭ + ДНК-АО (4), при ионной силе створа 0.02 М. Кривая 4 является математической суммой значений  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  комплексов ДНК-БЭ и ДНК-АО, при соответствующих значениях  $r$ .

Интеркаляционный механизм связывания БЭ вносит основной вклад в стабилизацию дц-структуры ДНК (см. [19]). При низких концентрациях этого лиганда места для интеркаляции не насыщены, и по ходу плавления имеет место перераспределение связанных молекул БЭ с денатурированными на еще не денатурированные участки. Это приводит к увеличению значения  $\Delta T$  комплексов по сравнению с  $\Delta T$  ДНК. С увеличением концентрации БЭ по мере насыщения интеркаляционных мест перераспределение прекращается, вследствие чего величина  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  достигает своего максимума, а при дальнейшем увеличении концентрации БЭ начинает уменьшаться. Этот факт обусловлен тем, что молекулы БЭ начинают связываться с ДНК полуинтеркаляционным и электростатическим способами. В то же время величина  $\delta(1/T_m)$  в зависимости от  $r$  возрастает, поскольку БЭ является стабилизатором двухцепочечной структуры ДНК. Стабилизация дц-структуры ДНК обнаруживается и при интеркаляционном способе связывания АО с ней. Тем не менее, этот эффект намного сильнее проявляется в случае БЭ, что может быть результатом того, что средство БЭ с

дц-ДНК существенно больше, чем АО. Несмотря на это, при совместном связывании обоих лигандов значения  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  практически совпадают с аналогичными значениями, полученными для комплексов АО-ДНК.

Известно, что величина  $\Delta T$  является мерой гетерогенности стекинг взаимодействий между АТ-АТ, АТ-ГЦ и ГЦ-ГЦ парами (см. [5] и цитируемую там лит.). Учитывая это, мы заключаем, что при связывании лиганда гетерогенность стекинг взаимодействий между парами оснований возрастает, при этом при интеркаляции БЭ проявляется некоторая предпочтительность к ГЦ парам. Исходя из того, что в случае ДНК-АО и ДНК-БЭ-АО значения  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  меньше, чем в случае ДНК-БЭ, мы полагаем, что имеет место уменьшение гетерогенности стекинг взаимодействий между указанными парами. Этот эффект является результатом того, что оба интеркалятора практически одинаково влияют на гетерогенность стекинг взаимодействий между парами оснований (в интервале  $0 < r \leq 0.01$  значения  $\delta(\Delta T/T_m^2)$ , полученные для комплексов ДНК-АО и ДНК-БЭ, практически не отличаются), вследствие чего  $\Delta T$  тройной системы близка к значениям этого параметра, соответствующего свободной ДНК, в то время как в случае отдельных комплексов этих лигандов с ДНК величина  $\Delta T$  значительно больше. Из полученных данных мы заключаем, что при относительно низких концентрациях обоих лигандов между ними не возникает конкуренции за места связывания. По мере увеличения концентраций обоих лигандов значения  $\Delta T$ , несмотря на то, что в случае их отдельных комплексов продолжают возрастать, начинают расходиться, и при этих значениях  $r$   $\Delta T$  тройной системы все еще остается меньше. При дальнейшем увеличении  $r$  ( $0.04 < r \leq 0.17$ ) значения  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  тройной системы ДНК-АО-БЭ и двойной системы ДНК-АО практически совпадают. Это указывает на то, что в этих условиях гетерогенность тройной системы приобретает свое максимальное значение, которое близко к таковому, соответствующему ДНК-АО системе. Интересным является то, что кривая 4 не совпадает с кривой 3, из чего следует, что влияние АО и БЭ на ширину интервала плавления ДНК при их совместном связывании с ДНК не является простой суммой их влияний при отдельном связывании.

Полученные данные также выявляют, что АО, по всей вероятности, связывается с ДНК двумя способами. На это указывает то, что кривая зависимости  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$ , возрастая при низких концентрациях АО, выходит на плато с увеличением значения  $r$ . Аналогичные результаты были получены для комплексов ДНК-МС. МС является акридиновым красителем и аналогом АО и при ионной силе раствора 0.02 М связывается с ДНК двумя способами – полуинтеркаляционным и электростатическим (см. [5]). При дальнейшем увеличении концентраций обоих лигандов интеркаляция молекул БЭ, а также АО прекращается, и БЭ начинает связываться с ДНК полуинтеркаляционным способом, что приводит к понижению значений  $\delta(\Delta T/T_m^2)$ . В этих условиях АО или не связывается с ДНК, или же связывается слабым (электростатическим) способом.

На рис. 2 приведены кривые зависимости  $\delta(1/T_m)$  от  $r$  комплексов БЭ-ДНК (кривая 1), АО-ДНК (кривая 2), ДНК-БЭ-АО (кривая 3) и БЭ-

ДНК+АО-ДНК (кривая 4). Из рисунка видно, что и в случае БЭ, и в случае АО кривые зависимости  $\delta(1/T_m)$  от  $r$  возрастают с увеличением концентраций лигандов в растворе. Это указывает на то, что оба лиганда стабилизируют дц-структуру ДНК в интервале изменения  $0 < r \leq 0,33$ . При этом стабилизирующее влияние БЭ на нативную структуру ДНК намного значительнее, чем АО. При совместном же связывании этих лигандов с ней значения  $\delta(1/T_m)$  меньше, чем при отдельном связывании БЭ, однако кривые 3 и 4 совпадают, что указывает на то, что совместное влияние связанных молекул БЭ и АО на температуру плавления ДНК практически является математической суммой их влияний на этот параметр при отдельном связывании. Необходимо отметить, что в случае МС при аналогичных условиях обнаруживается иная картина – молекулы БЭ и МС конкурируют за места связывания полуинтеркаляционным способом, поскольку при ионной силе раствора 0.02 М МС полностью не интеркалирует в ДНК [5].

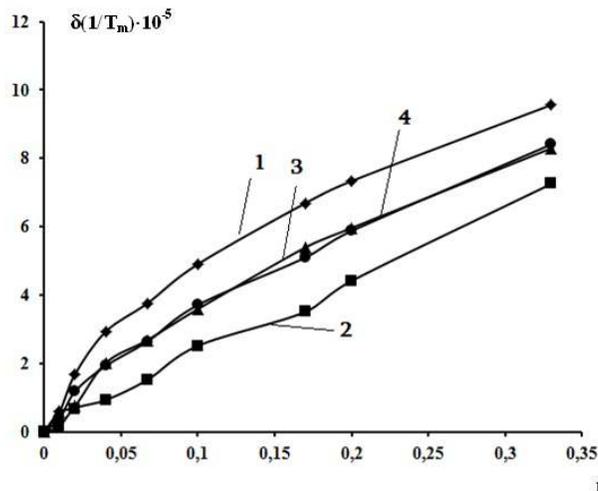


Рис. 2. Кривые зависимости  $\delta(1/T_m)$  от  $r$  комплексов БЭ-ДНК (1); АО-ДНК (2), БЭ-ДНК-АО (3) и ДНК-БЭ + ДНК-АО (4), при ионной силе раствора 0.02 М. Кривая 4 является математической суммой значений  $\delta(1/T_m)$  комплексов ДНК-БЭ и ДНК-АО при соответствующих значениях  $r$ .

Полученные данные также указывают на то, что в случае АО полуинтеркаляционный тип связывания с дц-ДНК отсутствует. Исходя из этого полагаем, что колоколообразное изменение зависимости  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$  в случае БЭ обусловлено тремя способами связывания этого лиганда с ДНК – интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим, в случае же совместного с АО связывания – проявлением интеркаляционного и электростатического способов связывания обоих лигандов. При этом константа связывания АО интеркаляционным способом, по всей вероятности, отличается от таковой БЭ, вследствие чего в данном случае влияние обоих лигандов на зависимость величины  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$  аналогична этой

же зависимости для случая связывания одного лиганда с ДНК тремя способами.

**Закключение.** Таким образом, полученные данные указывают на то, что АО и БЭ, являясь интеркаляторами, по-разному влияют на ширину интервала плавления ДНК. С другой стороны, оба лиганда являются стабилизаторами дц-структуры ДНК. При этом интеркаляционный способ связывания БЭ превалирует над интеркаляцией АО. Также выявлено, что в противоположность БЭ полуинтеркаляционный способ связывания АО с ДНК не обнаруживается.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного комитета по науке МОН РА в рамках научного проекта № 15Т-1F105.

Ереванский государственный университет

**П. О. Вардеванян, А. П. Антонян, М. А. Парсаданян, В. Г. Саакян**

### **Исследование совместного связывания акридинового оранжевого и бромистого этидия с ДНК**

Проведено исследование тройной системы ДНК-БЭ-АО при ионной силе раствора 0.02М, в интервале изменения концентрационного соотношения лиганд/ДНК  $0 < r \leq 0.33$  и определены значения изменений параметров (температуры плавления  $(\delta(1/T_m))$  и ширины интервала плавления  $(\delta(\Delta T/T_m^2))$ ) этих комплексов. Из полученных данных следует, что зависимость  $\delta(1/T_m)$  от  $r$ , полученная для тройной системы, по форме совпадает с аналогичными кривыми, полученными для комплексов БЭ-ДНК. Аналогичная зависимость получается и при математическом суммировании значений  $\delta(1/T_m)$ , полученных для комплексов ДНК-БЭ и ДНК-АО. Зависимость  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $r$ , полученная для тройной системы, по форме совпадает с аналогичными кривыми, полученными для комплексов БЭ-ДНК, а также с помощью математического суммирования значений  $\delta(\Delta T/T_m^2)$ , полученных для комплексов ДНК-БЭ и ДНК-АО, однако не является их простой суммой.

**Պ. Հ. Վարդևանյան, Ա. Պ. Անտոնյան, Մ. Ա. Փարսադանյան ,  
Վ. Գ. Սահակյան**

### **ԴՆԹ-ի հետ ակրիդինային նարնջազույնի և եթիդիումի բրոմիդի համատեղ կապման ուսումնասիրությունը**

Ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-ԷԲ-ԱՆ եռակի համակարգը լուծույթի 0.02 Մ իոնական ուժի պայմաններում, լիզանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերության  $0 < r \leq 0.33$  փոփոխության միջակայքում և որոշվել են այդ կոմպլեքսների հալման պարամետրերի (հալման ջերմաստիճանի  $(\delta(1/T_m))$  և հալման միջակայքի լայնության  $(\delta(\Delta T/T_m^2))$ ) փոփոխությունների արժեքները: Ստացված տվյալներից հետևում է, որ եռակի համակարգի դեպքում  $\delta(1/T_m)$  կախվածությունը  $r$ -ից համընկնում է ԴՆԹ-ԷԲ և ԴՆԹ-ԱՆ կոմպլեքսների համար ստացված  $\delta(1/T_m)$  մաթեմատիկական գումարը ներկայացնող

կորի հետ:  $r$ -ից  $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի կախվածությունը, որը ստացվել է եռակի համակարգի համար, իր ձևով համապատասխանում է համանման կորերին, որոնք ստացվել են ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների, ինչպես նաև ԴՆԹ-ԷԲ և ԴՆԹ-ԱՆ կոմպլեքսների  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  արժեքների մաթեմատիկական գումարման միջոցով, սակայն եռակի համակարգերի դեպքում այդ կախվածությունը չի համընկնում վերջինիս հետ:

**P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, V. G. Sahakyan**

### **Study of Joint Binding of Acridine Orange and Ethidium Bromide with DNA**

The study of the triple system DNA-EtBr-AO at 0.02 M ionic strength of a solution and  $0 < r \leq 0.33$  interval of ligand/DNA concentration ratio change has been carried out and the values of changes of parameters (melting temperature ( $\delta(1/T_m)$ ) and melting interval width ( $\delta(\Delta T/T_m^2)$ )) of these complexes were determined. From the obtained data it is followed that  $\delta(1/T_m)$  dependence on  $r$  for the triple system coincides by its form with analogous curves obtained for DNA-EtBr complexes. Analogous dependence was obtained at mathematical sum of  $\delta(1/T_m)$  values for DNA-EtBr and DNA-AO complexes as well. Dependence of  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  on  $r$  obtained for the triple system coincides with analogous curves obtained for DNA-EtBr complexes by its form as well as with that obtained through mathematical sum of  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  values for DNA-EtBr and DNA-AO complexes.

### **Литература**

1. Франк-Каменецкий М. Д. Век ДНК. М. КДУ. 2004. 240 с.
2. Gowda K.R.S, Blessy B.M., Sadhamani C.N., Naik H.S.B – Biomedicine and Biotechnology. 2014. V. 2. N 1. P. 1-9.
3. Tsuboi M., Benevides J.M., Thomas G.J.Jr. – Biophysical Journal. 2007. V. 92. P. 928-934.
4. Pasternack R. F., Goldsmith J. I., Szep S., Gibbs E. J. –Biophys J. 1998. V. 75. P. 1024-1031.
5. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Torosyan M., Karapetian A. – J. of Biomol. Struct. and Dyn. 2015. V. 34. P. 1377-1382.
6. Nafisi Sh, Saboury A. A., Keramat N., Neault J.-F., Tajmir-Riahi H.-A. – Journal of Molecular Structure. 2007. V. 827. P. 35-43.
7. Kusuzaki K., Murata H., Matsubara T., Miyazaki Sh., Shintani K., Seto M., Matsumine Ak., Hosoi H., Sugimoto T., Uchida A. – Photochemistry and Photobiology. 2005. V. 81. P. 705-709.
8. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. Biochemical Pharmacology, 1983, 32, p. 3679-3693.
9. Lantukh Yu. D., Pashkeich S. N., Letuta S. N., Alidzhanov E. K., Kul'sarin A. A. – Optics and Spectroscopy. 2013. V. 114. P. 283-287.
10. Lantukh Yu. D., Pashkeich S. N., Letuta S. N., Alidzhanov E.K., Kul'sarin A. A. – Optics and Spectroscopy. 2011. V. 110. P. 880-884.
11. Lai Sh., Chang X., Tian L., Wang S., Bai Yu., Zhai Yu. Micrichim. Acta, 2007, 156, p. 225-230.
12. Rawtani D., Agrawai Y. K. – BioNanoSci. 2013. V. 3. P. 52-57.
13. Rohs R., Sklenar H. – J. Biomol. Struct. Dyn. 2004. J. Biomol. Struct. and Dyn. V. 21. P. 699-711.

14. *Hossain M., Giri P., Kumar G. S.* – DNA and Cell Biology. 2008. V. 27. P. 81-90.
15. *Zhao G.C., Zhu J.J., Zhang J. J., Chen H. Y.* – Anal. Chim. Acta. 1999. V. 394. P. 337-344.
16. *Han F., Taulier N., Chalikian T.* – Biochemistry. 2005. V. 44. P. 9785-9794.
17. *Ismail M.A., Rodger P.M., Rodger A.* – J. Biomol. Struct. Dyn., 2000, 11, p. 335-348.
18. *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. Dyn. 1996. V. 14, P. 275-283.
19. *Suh D.* – Exp. and Mol. Medicine. 2000. V. 32. P. 204-209.
20. *Xinhui H., Wang Q., Pingang H., Fang Y.* – Analytical Sciences. 2002. V. 18. P. 645-650.
21. *Tang Tz.Ch., Huang H-J.* – Electroanalysis. 1999. Electroanalysis. 1999. V. 11. P. 1185-1190.