

БИОФИЗИКА

УДК. 577.113.6

Ս. Օ. Վարդևանյան, Ք. Ա. Կարապետյան, Մ. Ա. Շագինյան, Ա. Ս. Անտոնյան

**Конкуренентность связывания бромистого этидия и Hoechst 33258 с ДНК**

(Представлено чл.-кор. НАН РА А. А. Трчуняном 21/IV 2007)

**Ключевые слова:** *бромистый этидий (EtBr), Hoechst 33258 (H33258), совместное связывание, конкуренция*

Задача теоретического обоснования путей конструирования новых соединений актуальна в связи с повышенным интересом к синтезу новых биологически активных соединений с высокой чувствительностью и специфичностью к субстрату. Эта проблема может быть решена путем использования не связанных между собой непосредственно (а лишь через субстрат, т.е. через нуклеиновые кислоты), но имеющих согласованные комплексообразующие и физические свойства лигандов. В настоящей работе выбрана одна из таких систем: бромистый этидий (EtBr) и Hoechst 33258 (H33258). EtBr является классическим интеркалятором, т.е. связывается с ДНК путем вклинивания между соседними парами оснований спирали с некоторым предпочтением к ее GC-богатому участкам [1-3]. H33258 - "внешне" связывающееся с ДНК соединение, специфичное к участкам двойной спирали полинуклеотида, содержащим три последовательно расположенных АТ- и одну GC-пары оснований [4,5].

Вследствие различного характера связывания и специфичности EtBr и H33258 к последовательностям оснований ДНК совместное использование этих лигандов может существенно повысить информативность исследований в сфере изучения 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 особенностей совместного взаимодействия EtBr и H33258 с ДНК в зависимости от

отношения лиганд/ДНК, при различных ионных силах раствора.

В работе были использованы ДНК тимуса теленка (сверхчистая, любезно предоставленная проф. Д. Ю. Ландо), EtBr, Hoechst 33258 ("Serva", Германия), NaCl, Na-цитрат (ос. ч.). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Растворы препаратов готовились в стандартном солевом цитратном растворе (SSC), содержащем  $10^{-5}$ М ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) с ионными силами  $\mu = 0.002$  и  $0.02$  М  $\text{Na}^+$ . SSC готовили с бидистиллированной водой. Концентрации ДНК и лигандов определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции:  $\varepsilon_{260} = 6600 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  для ДНК,  $\varepsilon_{480} = 5850 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  для EtBr и  $\varepsilon_{343} = 42000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  для H33258. Соответствующие комплексы ДНК с лигандами получали смешением растворов ДНК и EtBr и H33258 в соответствующих пропорциях: соотношение концентраций ДНК и лигандов  $r_b$  ( $r_b = \text{лиганд}/\text{ДНК}$ ) изменялось в интервале  $0 \leq r_b \leq 0.5$  при ионной силе  $0.02$  М  $\text{Na}^+$  и  $0 \leq r_b \leq 0.2$  при ионной силе  $0.002$  М  $\text{Na}^+$  раствора. При определенных соотношениях концентраций H33258/ДНК в растворе образуются хлопья ( $r_b \geq 0.5$  при  $0.02$  М  $\text{Na}^+$  и  $r_b \geq 0.2$  при  $0.002$  М  $\text{Na}^+$ ).

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами осуществлялось на спектрофотометре PUE UNICAM-SP8-100 (Англия). Растворы препаратов помещались в односантиметровые кварцевые кюветы с герметически закрытыми тефлоновыми крышками. Кюветы 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%.

Кривые плавления комплексов получали, как описано в [2].

Ранее нами экспериментально получено, что при ионной силе  $20$  мМ  $\text{Na}^+$  зависимость изменения ширины интервала плавления ( $\delta\Delta T$ ) комплексов EtBr с ДНК от концентрации лиганда имеет колоколообразную форму, а в случае H33258, принимая отрицательные значения, убывает и начиная с некоторых значений  $r_b$  ( $r_b \geq 0.15$ ), оставаясь отрицательной, стремится к постоянной величине [2,6]. В то же время температура плавления ( $T_m$ ) комплексов ДНК как с EtBr, так и с H33258, как и ожидалось, монотонно растет во всем интервале изменения  $r_b$  вследствие стабилизации двухцепочечной (дц) структуры ДНК [2,6].

С этой точки зрения интересно, как эти же лиганды будут взаимодействовать с ДНК и влиять на термодинамические параметры перехода спираль-клубок при совместном связывании. С целью выяснения механизмов

их совместного связывания с ДНК нами исследовано комплексообразование EtBr и H33258 при ионной силе раствора 20 и 2 мМ Na<sup>+</sup>. Для сравнения исследовались также комплексы ДНК-EtBr и ДНК-H33258 в тех же условиях. На рис. 1 приведены кривые зависимостей  $\delta\Delta T$  и  $\delta T_m$  от  $r_b$  комплексов ДНК-EtBr, ДНК-H33258 и EtBr-H33258-ДНК при  $\mu = 20$  мМ Na<sup>+</sup>, полученные на основании кривых плавления ДНК тимуса теленка и ее комплексов с этими лигандами (кривые не приведены). Как видно, при ионной силе  $\mu = 20$  мМ Na<sup>+</sup> ширина интервала плавления ( $\Delta_0 T$ ) чистой ДНК меньше, чем  $\Delta T$  комплексов при отдельном, а также при совместном с H33258 взаимодействии EtBr с ДНК при малых концентрациях лигандов ( $r_b < 0.05$ ), в то время как при отдельном взаимодействии H33258 с ДНК  $\Delta T$  меньше, чем  $\Delta_0 T$  чистой ДНК. Вследствие того, что EtBr практически не проявляет специфичности к определенным основаниям ДНК при интеркаляционном связывании и в процессе плавления его молекулы перераспределяются из денатурированных на еще не денатурированные участки, интервал плавления комплексов увеличивается. В противоположность этому в тех же условиях H33258 преимущественно связывается с AT-последовательностями гетерогенной ДНК, что уменьшает разность температур плавления AT- и GC-богатых блоков ( $T_{GC} - T_{AT}$ ). Полученные экспериментальные данные указывают на то, что при  $\mu = 20$  мМ Na<sup>+</sup> и низких концентрациях при совместном взаимодействии лигандов роль EtBr в стабилизации дц-структуры ДНК более выражена, чем роль H33258. Причем при тех же значениях  $r_b$  в случае комплексов EtBr-ДНК значения  $\delta\Delta T$  больше, чем для комплексов EtBr-H33258-ДНК. При  $0 \leq r_b \leq 0.05$  концентрации лигандов достаточно малы и места связывания для обоих лигандов на ДНК практически независимы друг от друга, поэтому естественно предположить, что H33258 сильно затрудняет связывание EtBr с ДНК. Увеличение концентрации лигандов в комплексе EtBr-H33258-ДНК приводит к уменьшению значений  $\delta\Delta T$  (рис. 1, в), поскольку усиливается влияние H33258 на термостабильность AT-богатых участков, несмотря на то, что возрастание концентраций лигандов увеличивает отрицательное воздействие молекулы EtBr на сродство H33258 к ДНК. При более высоких концентрациях лигандов H33258 блокирует места связывания в малом желобке ДНК, вследствие чего уменьшается возможность связывания EtBr с ДНК. Поэтому в этих условиях EtBr начинает взаимодействовать с одноцепочечными участками ДНК, дестабилизируя ее нативную структуру, что приводит к резкому увеличению  $\delta\Delta T$  [1,2]. На рис. 1, г приведена кривая зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r_b$  для EtBr-H33258-ДНК (кривая 1), полученная при сложении соответствующих кривых в случае отдельного взаимодействия этих лигандов с ДНК, которая существенно отличается от

кривой 1 на рис. 1, в. Как видно, в интервале изменения концентрации лигандов  $0.167 \leq r_b \leq 0.5$  ход кривой  $\delta\Delta T$  при совместном взаимодействии лигандов с ДНК радикально отличается от хода кривых при раздельном взаимодействии этих лигандов.

Ранее было показано, что в указанном интервале при увеличении концентрации EtBr  $\delta\Delta T$  уменьшается, а при более высоких значениях  $r_b$  ( $r_b > 0.5$ ) интервал плавления комплексов EtBr-ДНК резко возрастает (см. [1,2]). Из приведенного рисунка видно, что в указанном интервале  $r_b$   $\delta\Delta T$  комплексов ДНК-EtBr-H33258 увеличивается, в то время как для EtBr наблюдается обратная картина (рис. 1, а, кривая 1), а для H33258 она не меняется (рис. 1, в, кривая 1). Это связано с тем, что если в случае EtBr резкое увеличение имеет место при более высоких концентрациях лиганда, то при совместном взаимодействии увеличение  $\delta\Delta T$  наблюдается при более низких концентрациях EtBr.

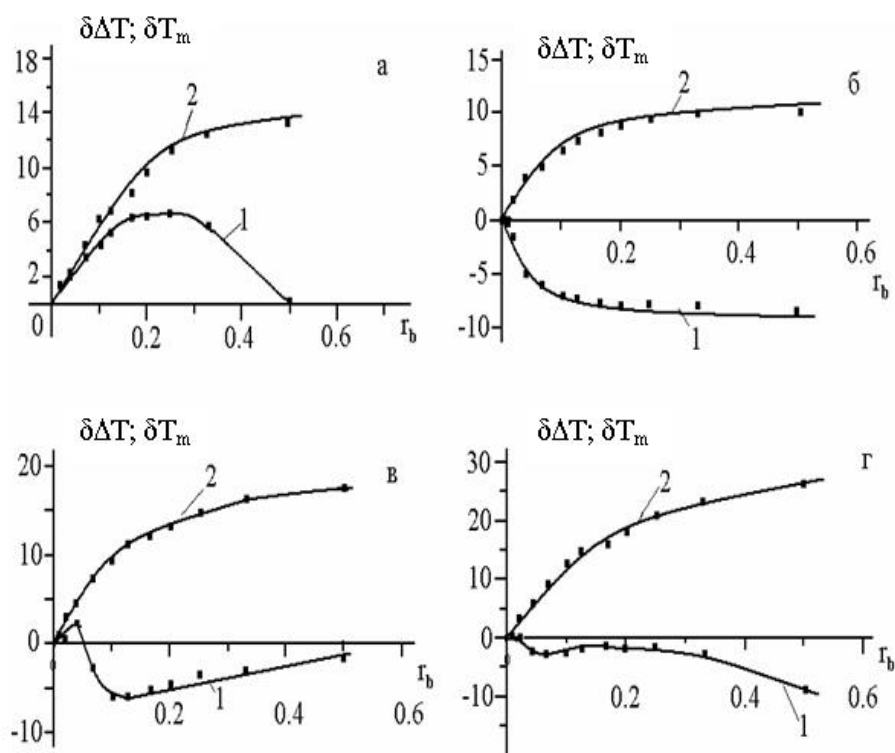


Рис.1. Экспериментально полученные зависимости  $\delta\Delta T$  (1) и  $\delta T_m$  (2) плавления комплексов EtBr-ДНК (а), H33258-ДНК (б), EtBr-H33258-ДНК (в) и тех же зависимостей, полученных сложением соответствующих кривых в случае отдельного взаимодействия этих лигандов с ДНК тимуса теленка (г) при ионной силе 20мМ  $\text{Na}^+$ , pH 6.9

Кроме этого, при больших концентрациях EtBr при отдельном взаимодействии  $T_m$  комплексов уменьшается [1,2], в то время как при совместном

с Н33258 взаимодействии уменьшения  $T_m$  не наблюдается. Этот экспериментальный факт указывает на то, что в данном случае взаимодействие двух лигандов не независимо друг от друга.

На рис. 2 приведены зависимости  $\delta\Delta T$  и  $\delta\Delta T_m$  от  $r_b$  комплексов EtBr-ДНК (а), Н33258-ДНК (б), EtBr-Н33258-ДНК (в), полученные при ионной силе раствора 2 мМ Na<sup>+</sup>. Из рисунка видно, что в этих условиях ход кривой зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r_b$  комплексов EtBr-ДНК практически не отличается от таковой, полученной при 20 мМ Na<sup>+</sup> (рис. 2, а, кривая 1), в то время как эта же зависимость для комплексов Н33258-ДНК радикально отличается от полученной при 20 мМ Na<sup>+</sup> (рис. 2, б, кривая 1). При низких ионных силах  $\mu \approx 2$  мМ Na<sup>+</sup> этот лиганд не проявляет специфичности к АТ последовательностям, поэтому  $\Delta T$  комплексов при увеличении концентрации лиганда возрастает (см. [6]).

При математическом сложении значений  $\Delta T$  отдельных комплексов этих лигандов с ДНК увеличение абсолютной величины  $\Delta T$  комплексов больше, чем при совместном связывании (ср. кривые 2 на рис. 2, в и г). При этом, как видно из приведенных экспериментальных данных, при совместном связывании EtBr и Н33258 с ДНК зависимость  $\delta\Delta T$  от  $r_b$  существенно отличается от аналогичных кривых, полученных как для комплексов EtBr с ДНК при 2 и 20 мМ Na<sup>+</sup>, так и для комплексов EtBr-Н33258-ДНК при 20 мМ Na<sup>+</sup> (ср. кривую 1 на рис. 2, в с кривыми 1 на рис. 1, в и 2, а);  $\delta\Delta T$  при совместном взаимодействии растет при низких концентрациях лигандов ( $r_b \leq 0.05$ ), затем, с увеличением  $r_b$  ( $0.05 \leq r_b \leq 0.125$ ), она уменьшается и при  $r_b \approx 0.125$  практически равняется нулю. Этот экспериментальный факт является следствием того, что молекулы EtBr интеркалированы в плоскость между парами оснований в большом желобке ДНК, а молекулы Н33258 связаны в малом желобке. Поэтому места связывания на полинуклеотиде для EtBr блокированы, вследствие чего этот лиганд предпочтительно взаимодействует с одноцепочечными участками ДНК, тем самым уменьшая ширину интервала плавления. При дальнейшем увеличении концентраций лигандов ( $r_b \geq 0.125$ ) в случае EtBr резко возрастает  $\delta\Delta T$  (см. [2]). Этот параметр не меняется при совместном взаимодействии (рис. 2, в, кривая 1) из-за возникновения конкуренции между лигандами за места связывания в малом желобке ДНК: этот эффект ярко выражен при низких ионных силах раствора, поскольку для обоих гидрофобных лигандов энергетически не выгодно внешнее связывание и контакт с молекулами воды в малом желобке ДНК.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что:

- совместное взаимодействие EtBr и Н33258 с ДНК не является простой суммой

их отдельного связывания;

- при совместном взаимодействии места для полуинтеркаляционного связывания EtBr в малом желобке блокированы молекулами H33258.

Дальнейшее детальное изучение конкурентного взаимодействия лигандов поможет объяснить резкое отличие значений  $\delta T_m$  при ионных силах раствора 2 и 20 мМ Na<sup>+</sup>.

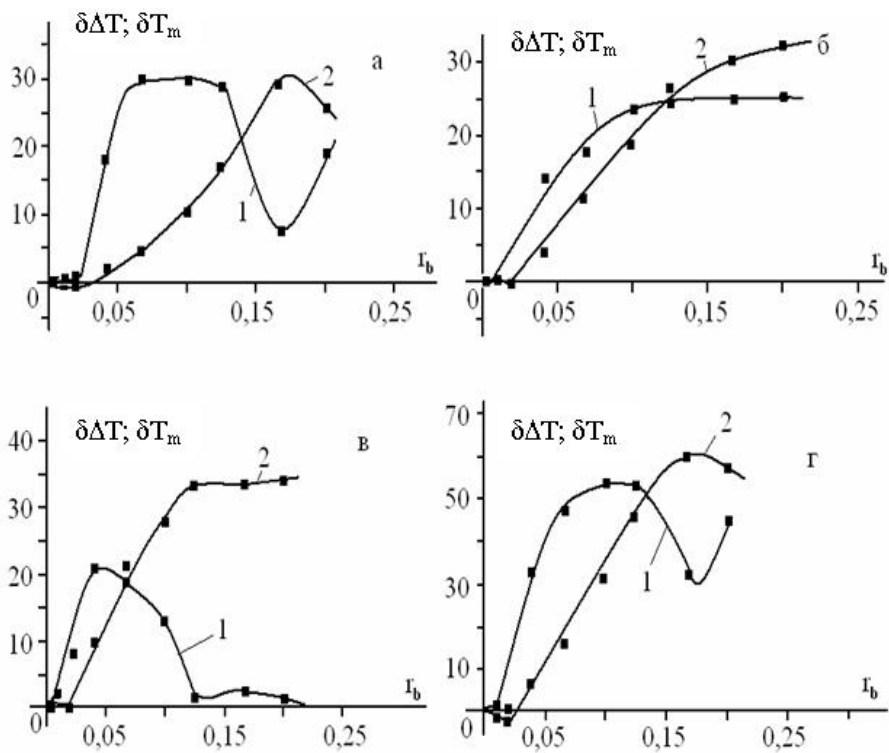


Рис.2. Экспериментально полученные зависимости  $\delta\Delta T$  (1) и  $\delta T_m$  (2) плавления комплексов EtBr-ДНК (а), H33258-ДНК (б), EtBr-H33258-ДНК (в) и тех же зависимостей, полученных сложением соответствующих кривых в случае отдельного взаимодействия этих лигандов с ДНК тимуса теленка от  $r_b$  (г) при ионной силе 2мМ Na<sup>+</sup>, рН 6.9

Ереванский государственный университет

**Պ. Հ. Վարդևանյան, Ռ. Ա. Կարապետյան, Մ. Ա. Շահինյան, Ա. Պ. Անտոնյան**

**Էթիդիում բրոմիդի և Hoechst 33258-ի ԳՆԹ-ի հետ կապման մրցակցությունը**

Առաջին անգամ փորձարարականորեն ցույց է տրված, որ ԳՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և Hoechst 33258-ի համատեղ փոխազդեցության դեպքում, նրանց կոնցենտրացիայից կախված, դիտվում է դրանցից մեկի գերակշռող ներազդեցությունը կենսապոլիմերի հետ դրանց կոմպլեքսի հավան Կարամետրերի վրա. լուծույթի 0.02 M Na<sup>+</sup> իոնական ուժի և լիգանդների

փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ( $0 \leq r_b \leq 0.05$ ) ավելի արտահայտված է ԷԲ-ի ներազդեցությունը, համեմատաբար մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում ( $0.05 \leq r_b \leq 0.167$ ) զգալիորեն ուժեղանում է H33258-ի ներազդեցությունը: Լիգանդների ավելի մեծ կոնցենտրացիաների ( $0.167 \leq r_b \leq 0.5$ ) և լուծույթի  $0.02 \text{ M Na}^+$ , ինչպես նաև  $0.002 \text{ M Na}^+$  իոնական ուժերի դեպքում դիտվում է մրցակցություն լիգանդների միջև՝ ԴՆԹ-ի վրա կապման միևնույն տեղամասի համար:

P. O. Vardevanyan, R. A. Karapetyan, M. A. Shahinyan, A. P. Antonyan

### Competition of EtBr and Hoechst 33258 Binding with DNA

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  $0.02 \text{ M Na}^+$ : at small concentration of ligands the ( $0 \leq r_b \leq 0.05$ ) the influence EtBr is more expressed; at the rather large concentration ( $0.05 \leq r_b \leq 0.167$ ) influence of H33258 considerably amplifies. At higher concentration of ligands ( $0.167 \leq r_b \leq 0.5$ ) at  $0.02 \text{ M Na}^+$ , and also at ionic strength of solution  $0.002 \text{ M Na}^+$  the competition between two ligands for the same site of binding on DNA is observed.

### Литература

1. Karapetian A. T., Mehrabian N. M., Terzikian G. A., Vardevanian P. O., Antonyan A. P., Borisova O. F., Frank-Kamenetskii M. D. – J. Biomol. Struct.Dyn. 1996. N14. P.275-283.
2. Vardevanyan P. O., Antonyan A. P., Manukyan G. A., Karapetian A. T. – Experimental and Molecular Medicine. 2001. N33. P. 205-208.
3. Vardevanyan P. O., Antonyan A. P., Parsadanyan M. A., Davtyan H. G., Karapetyan A. T. – Experimental and Molecular Medicine. 2003. N35. P. 527-533.
4. Neidle S. – Nat. Prod. 2001. V. 18. P. 291-309.
5. Wemmer D. E. – Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.. 2000. V. 29. P.439-461.
6. Vardevanyan P. O., Antonyan A. P., Pirumyan K. V., Boyajyan Z. R., Karapetian A. T. – J. Biomol. Struct. Dyn. 2005. V. 22. N6. P. 860-861.
7. Борисова О. Ф., Щелкина А. К., Карапетян А. Т., Суровая А. Н. – Молекулярная биология. 1998. Т. 32. N5. С.855-862.