

УДК 577.323

А.Т. КАРАПԵՏՅԱՆ, Գ.Ա. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Ա.Ս. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Ս.Օ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК

Исследован переход спираль-клубок комплексов ДНК с бромистым этидием (БЭ) в интервале изменения ионной силы  $2,2 \cdot 10^{-3} M \leq \mu_{Na^+} \leq 2,2 \cdot 10^{-2} M$ . Выявлено, что при определенных высоких соотношениях лиганд – ДНК интервал перехода комплекса  $\Delta T$  становится равным интервалу перехода “чистой” ДНК  $\Delta_0 T$ . Показано, что соотношение, при котором происходит выравнивание, зависит от ионной силы раствора.

Определение стабилизирующего и дестабилизирующего эффектов различных лигандов делает возможным выяснение механизмов, лежащих в основе функционирования ДНК [1,2]. С этой точки зрения интересен бромистый этидий (БЭ), являющийся стабилизатором двухцепочечной (дц) ДНК и обладающий высокой биологической активностью [2].

Сравнение теории с экспериментом выявило, что БЭ и актиномицин Д (АМД) взаимодействуют с дц- и одноцепочечной (оц) ДНК несколькими способами (мультимодальные лиганды). При этом число способов взаимодействия зависит от ионной силы раствора [3].

Мультимодальность взаимодействия приводит к тому, что при некоторых, вполне определенных высоких концентрациях лиганда наблюдаются увеличение ширины интервала конформационного перехода  $\Delta T$  комплексов ДНК с лигандом и понижение температуры –  $T_m$ , т.е. стабилизатор дц-ДНК (каковыми являются БЭ и АМД) превращается в дестабилизатор [3,4].

Настоящая работа посвящена экспериментальному изучению особенностей взаимодействия указанных мультимодальных соединений с ДНК различного GC-содержания в зависимости от концентрации лиганда и ионной силы раствора.

**Материалы и методы. Препараты.** В работе были использованы синтетический полинуклеотид poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], ДНК Сд-фага, ДНК *Cl. Perfringenes*, фирмы “Sigma” (США), ДНК тимуса теленка (т.т. N180 (2), высокоочищенного препарата, любезно предоставленного нам проф. Д.Ю. Ландо), GC-содержание которых равно 0%, 27%, 34% и 42% соответственно, БЭ фирмы “Serva” (Германия). Вышеназванные препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации используемых препаратов определяли абсорбционным методом, используя коэффициенты молярной экстинкции для poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] –  $\epsilon_{260} = 6600 M^{-1} cm^{-1}$ , ДНК *Cl. Perfringenes* –  $\epsilon_{260} = 7400 M^{-1} cm^{-1}$ , ДНК т.т. –  $\epsilon_{260} = 6400 M^{-1} cm^{-1}$ , ДНК Сд –  $\epsilon$

$\epsilon_{260} = 6600 M^{-1} cm^{-1}$  и для БЭ –  $\epsilon_{480} = 5600 M^{-1} cm^{-1}$  [5, 6]. Исследования проводились в растворах 0,01; 0,05; 0,1хSSC (1хSSC содержит 0,15 М NaCl; 0,015 М Na-цитрат),  $10^{-5}$  М ЭДТА. Ионная сила изменялась в интервале  $2,2 \cdot 10^{-3} \leq \mu_{Na^+} \leq 2,2 \cdot 10^{-2}$  М.

Спектрофотометрические измерения исследовались на спектрофотометре PVE Unicam-SP8-100 (Англия).

Плавление ДНК и ее комплексов с БЭ проводили в герметически закрытых кварцевых кюветках, помещенных в термостатическую ячейку спектрофотометра. Нагрев осуществлялся с помощью программного устройства со скоростью 0,25 град/м. Поглощение ( $A_{260}$ ) выводилось на программируемый микрокалькулятор HP 97S I/O.

$T_m$  и  $\Delta T$  определяли, как описано в работе [7]. Во избежание возможных статистических ошибок плавление комплексов ДНК-БЭ проводили одновременно с плавлением “чистой” ДНК.

Для исключения погрешностей, обусловленных светорассеянием вследствие образования агрегатов, во всех экспериментах проводили контроль отношения  $A_{320}/A_{260}$ , которое не превышало допустимых норм.

**Результаты и обсуждения.** Ранее было показано, что БЭ, АМД являются мультимодальными лигандами при их взаимодействии с ДНК [3, 4]. При этом, по сравнению с чистой ДНК, кривые плавления ее комплексов с названными лигандами сдвигаются в сторону высоких температур, т.е. они при определенных концентрациях являются стабилизаторами двухцепочечной структуры ДНК [3,8–12]. Теоретически и экспериментально показано, что зависимость изменения  $\Delta T$  от соотношения концентраций  $c = 2D/P$  (где D – полная концентрация лиганда в растворе, P – концентрация фосфатных групп ДНК) имеет колоколообразную форму. Значения  $\Delta T$  сначала возрастают и, проходя через слабовыраженный максимум, уменьшаются и при соблюдении определенных условий [6]  $\Delta T$  комплекса становятся равной  $\Delta T$  чистой ДНК. При дальнейшем увеличении концентрации лиганда  $\Delta T$  возрастает, в то время как  $T_m$  понижается [3, 4]. При этом анализ экспериментальных данных показал, что при низких ионных силах стабилизирующие эффекты БЭ и АМД на двойную спираль ДНК различны [4, 12].

На рис.1 приведены теоретические кривые зависимости  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $c$ . Как видно из приведенного рисунка (кр. 1), при ионной силе  $2,2 \cdot 10^{-3}$  М  $Na^+$  резко повышается максимум зависимости величины  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от концентрации в случае БЭ, тогда как в случае АМД при  $2,2 \cdot 10^{-3}$  М  $Na^+$ , а также АМД и БЭ при  $2,2 \cdot 10^{-2}$  М  $Na^+$  максимум практически остается неизменным (кр. 2, 3). Такой результат теория дает при подборе соответствующих параметров, где, наряду с сильными способами связывания, учитывается также слабое связывание. По-видимому, оно обусловлено электростатическим (крайне слабым) взаимодействием положительно заряженных групп БЭ с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, которое отсутствует в случае АМД. Доказательством такого предположения может служить тот экспериментальный факт, что при увеличении ионной силы раствора до  $2,2 \cdot 10^{-2}$  М  $Na^+$  фосфатные группы оказываются экранированными ионами  $Na^+$ , что препятствует электростатическому связыванию БЭ с ДНК, и зависимость  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от концентрации БЭ становится такой же, как и для АМД. Дальнейшее же увеличение ионной силы до

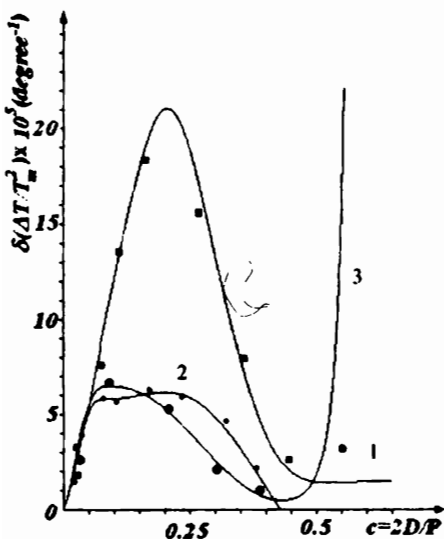


Рис.1. Теоретические кривые зависимостей  $\delta(\Delta T/T_m^2) \cdot 10^5$  от концентрации лиганда ( $c=2D/P$ ), рассчитанные для определенных значений параметров теории (см. [3]), на которых отложены экспериментальные точки: 1 - БЭ при  $\mu_{Na^+} = 2,2 \cdot 10^{-3} M$ , 2 - АМД при  $\mu_{Na^+} = 2,2 \cdot 10^{-3} M$ , 3 - БЭ и АМД при  $\mu_{Na^+} = 2,2 \cdot 10^{-2} M$ .

концентрации лиганда, полученные на основании кривых плавления при ионных силах  $2,2 \cdot 10^{-3} M$ ;  $10^{-2} M$  и  $2,2 \cdot 10^{-2} M Na^+$ . Как видно из рисунка 3А, зависимость  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $c$  постепенно уменьшается и при определенных высоких концентрациях лиганда, величины которых зависят от ионной силы раствора, достигает нулевого значения (кр. 1-3), т.е. интервалы плавления комплекса и чистой ДНК становятся равными.

При уменьшении ионной силы раствора зависимость  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  от  $c$  становится равной нулю при более высоких концентрациях лиганда, что, повидимому, обусловлено появлением еще одного, слабого способа свя-

зависимость.

Для обоснования вышесказанного нами было проведено экспериментальное исследование перехода спираль-клубок комплексов ДНК с БЭ в интервале изменения ионной силы раствора  $2,2 \cdot 10^{-3} \leq \mu_{Na^+} \leq 2,2 \cdot 10^{-2} M$  при изменении концентрации лиганда в интервале  $0,25 \leq 2D/P \leq 0,60$ . На рис.2 приведены кривые плавления комплексов ДНК т.т.-БЭ при  $\mu_{Na^+} = 2,2 \cdot 10^{-2} M$ , которые, как видно из рисунка сдвигаются в сторону высоких температур при увеличении концентрации БЭ до  $c = 0,5$  (кр. 1-3), при этом ширина интервала плавления уменьшается и для кр. 3,  $\Delta T$  такая же, как для кривой (она не приводится) чистой ДНК. Дальнейшее увеличение концентрации лиганда приводит к понижению температуры плавления (кр. 4), при этом  $\Delta T$  комплекса возрастает.

На рис.3 приведены кривые зависимостей  $\delta(1/T_m)$  (Б) и  $\delta(\Delta T/T_m^2)$  (А) от

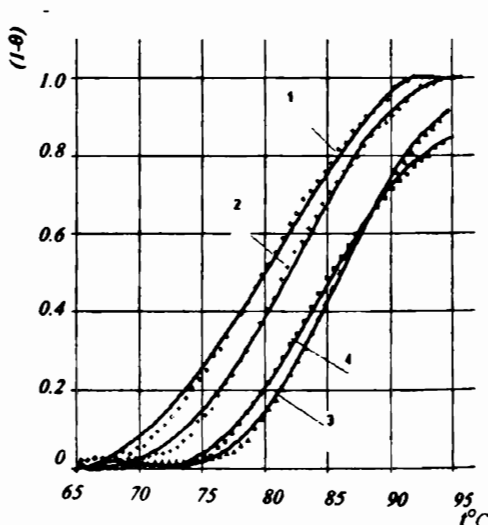


Рис.2. Кривые плавления комплексов ДНК т.т. с БЭ при различных  $c$ : 1 - 0,33; 2 - 0,4; 3 - 0,5; 4 - 0,51. Концентрация ДНК -  $6,6 \cdot 10^{-5} M$ ; pH 7,0;  $\mu_{Na^+} = 2,2 \cdot 10^{-2} M$ .

зывания. Этот способ взаимодействия, по всей вероятности, имеет электростатический характер, так как при высоких ионных силах происходит экранирование фосфатных групп ДНК, из-за чего положительно заряженные группы БЭ не взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, по этой причине насыщение мест связывания на дц-ДНК происходит при меньших концентрациях лиганда.

Дальнейшее увеличение концентрации лиганда приводит к возрастанию ширины интервала плавления комплекса, т.е. стабилизатор дц-структуры ДНК становится ее же дестабилизатором, т.к. в точке  $\delta(\Delta T/T_m^2) = 0$  участки ДНК насыщены лигандом, в то время как оц-участки еще остаются ненасыщенными, и лиганд начинает взаимодействовать с этими участками. Из рис. 3Б видно, что зависимость  $\delta(1/T_m)$  от  $c$  линейно возрастает до определенных значений  $c$  ( $c \approx 0,5$ ), а при более высоких значениях  $c$  эта зависимость отклоняется от линейности (кр. 1–3). Из рис. 3Б видно, что наклон кривых зависимостей  $\delta(1/T_m)$  от  $c$  уменьшается при увеличении ионной силы раствора. Это является косвенным подтверждением того, что при низких ионных силах у БЭ появляется дополнительный, слабый способ связывания с ДНК. Видимо, при низких ионных силах нет препятствия для реализации другого (других) более слабого (слабых) по сравнению с интеркаляционным и полуинтеркаляционным способами связывания типа взаимодействия. Эти результаты в пределах ошибки находятся в хорошем соответствии с литературными данными [3, 4].

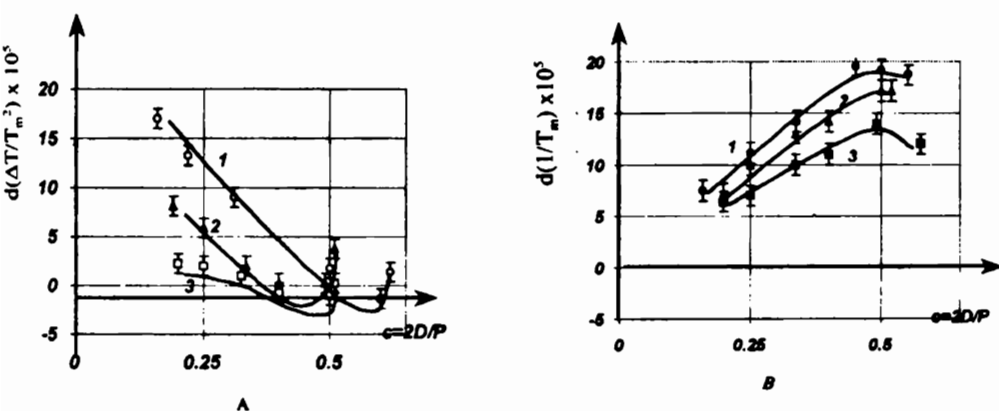


Рис.3. Экспериментальные кривые зависимостей  $\delta(\Delta T/T_m^2) \cdot 10^5$  (А) и  $\delta(1/T_m) \cdot 10^5$  (Б) от  $c$  ( $c=2D/P$ ), полученные из кривых плавления комплексов ДНК с БЭ при ионных силах  $\mu_{Na^+}=2,2 \cdot 10^{-3} M$  (кр. 1),  $\mu_{Na^+}=1,0 \cdot 10^{-2} M$  (кр. 2),  $\mu_{Na^+}=2,2 \cdot 10^{-2} M$  (кр. 3),  $pH=7,0$ . Показаны среднеквадратичные ошибки.

Впервые полученные экспериментальные результаты являются доказательством обсужденных в работах [3, 4] теоретических выводов о том, что число способов взаимодействия БЭ с ДНК зависит от ионной силы раствора и при насыщении мест связывания лигандом на дц-ДНК, когда еще существуют свободные участки на оц-ДНК, стабилизатор двойной спирали становится дестабилизатором.

Аналогичные исследования были проведены также с комплексами БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], ДНК Сд-фага и ДНК *Cl. Perfringenes* (экспе-

риментальные данные не приводятся). Эти данные находятся в хорошем соответствии с результатами, полученными для ДНК т.т. Эти результаты указывают на существование еще одного слабого способа взаимодействия БЭ с макромолекулой, которое выявляется при низких ионных силах  $\mu \approx 2,2 \cdot 10^{-3} M Na^+$  и не зависит GC-содержания ДНК.

Авторы благодарят проф. В.И. Иванова и проф. О.Ф. Борисову за обсуждение результатов.

Кафедра биофизики

Поступила 18.09.2000



## ЛИТЕРАТУРА

1. Lazurkin Yu.S., Frank-Kamenetskii M.D., Trifonow E.N. – Biopolymers, 1970, v.9, p. 1253–1263.
2. Wakelin L.P.G. – Medical. Res.Rev., 1986, v.6, p. 375–390.
3. 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, № 2, p. 275–283.
4. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Antonian A.P., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. – In Structure, Motion, Interaction and Expression of Biological Macromolecules. Adenine Press, 1998, p.259–266.
5. Косаганов Ю.Н., Лазуркин Ю.С., Сидоренко Н.В. – В сб.: Структура, свойства и генетические функции ДНК, (1-я конференция РБО ИАЭ им. Н.В.Курчатова). М., 1966, с. 53.
6. Полетаев А.И., Иванов В.И., Минченкова Л.Е., Щелкина А.К. – Мол.биол., 1969, т. 3, с. 303.
7. Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Terzikian G.A., Frank-Kamenetskii M.D. – J. Biomol. Struct. Dyn., 1990, v. 8, №1, p. 131–138.
8. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. – Мол. биол., 2000, т. 34, № 2, с. 310–315.
9. Тищенко Е.И., Карапетян А.Т., Борисова О.Ф. – Мол. биол., 1996, т. 30, в. 6, с.1370–1377.
10. Wadkins R.M., Jovin T.M. – Biochem., 1991, v. 30, p. 9469–9478.
11. Wadkins R.M., Jares-Erijman A.E., Klement R., Rüdiger A., Jovin T.M. – J.Mol.Biol., 1996, v. 262, p. 53–68.
12. Карапетян А.Т., Пермогоров В.И., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. – Мол. биол., 1972, т. 6, с. 867–874.

Ա.Թ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Գ.Ա. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Ա.Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ,  
Պ.Հ. ԿԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ

ԴՆԹ-ի ՀԵՏ ԷԹԻԴԻՈՒՄԻ ԲՐՈՍԻԴԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

## Ամփոփում

Հետազոտված է էթիդիումի բրոմիդի հետ ԴՆԹ-ի առաջացրած համաձիացությունների պարույր-կծիկ անցումը լիզանդի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում իոնական ուժի փոփոխության  $2,2 \cdot 10^{-3} M \leq \mu_{Na^+} \leq 2,2 \cdot 10^{-2} M$  միջակայքում: Բացահայտված է, որ լիզանդ/ԴՆԹ որոշակի բարձր հարա-

բերության դեպքում. համամիացության հալման միջակայքը՝  $\Delta T$ -ն, հավասարվում է մաքուր ԴՆԹ-ի հալման միջակայքին՝  $\Delta_0 T$ -ին: Ցույց է տրված, որ այդ հարաբերության արժեքը կախված է լուծույթի իոնական ուժից:

A.T. KARAPETIAN, G.A. MANOUGIAN, A.P. ANTONIAN, P.O. VARDEVANIAN

## THE INVESTIGATION OF THE PECULIARITIES OF THE DNA'S INTERACTION WITH EtBr

### Summary

DNA's helix-coil transition with ethidium bromide (EtBr) has been investigated within the limits of ionic strength  $2,2 \cdot 10^{-3} M \leq \mu \leq 2,2 \cdot 10^{-2} M$ . It was revealed that at some DNA-ligand ratios the transition width of complexes  $\Delta T$  becomes equal to the width of "free" DNA  $\Delta_0 T$ . It was shown that equalization takes place depending on the ionic strength of solution.