

Биология

УДК 577.113.6

А.П. АНТОНЯН, А.Г. ДАВТЯН, П.О. ВАРДЕВАНЯН

ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛУИНТЕРКАЛЯЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ
СВЯЗЫВАНИИ БЭ С ДНК

Исследованы особенности комплексообразования БЭ с ДНК. Показано, что хромофорное кольцо лиганда может вклиниваться в плоскость между соседними основаниями в одной из нитей двухцепочечной (дц) ДНК (полуинтеркаляционный комплекс). Получены кривые связывания БЭ с ДНК полуинтеркаляционным способом и определены параметры их взаимодействия – константа K , число оснований n , приходящихся на одно место связывания.

Обнаружено, что БЭ может связываться и с полностью денатурированной одноцепочечной (оц) ДНК. При этом механизм взаимодействия лиганда с оц-ДНК также носит полуинтеркаляционный характер, а параметры связывания (K и n) совпадают с таковыми при полуинтеркаляционном взаимодействии БЭ с дц-ДНК.

Существующие в настоящее время данные по взаимодействию бромистого этидия (БЭ) с ДНК указывают на то, что этот лиганд образует несколько типов комплексов с полинуклеотидами [1–6]. Показано также, что БЭ может связываться и с оц-ДНК [2, 3]. С другой стороны, известно, что актиномицин Д (АМД), являясь классическим интеркалятором, проявляет высокое сродство и специфичность в связывании с оц-ДНК [7]. Можно предположить, что образование комплексов этих лигандов с определенными последовательностями оц-ДНК может играть определенную роль в процессах, связанных с модуляцией генной активности [8].

Структура оц-ДНК в основном определена межмолекулярными связями между азотистыми основаниями (стекинг взаимодействия, водородные связи), которые в оц-ДНК более слабые, чем в дц-ДНК [8]. С другой стороны, необходимо отметить, что в оц-ДНК имеют место также внутримолекулярные взаимодействия, которые существенно влияют на стабилизацию данной структуры полинуклеотида, а также на его комплексы с лигандами [9, 10].

С этой точки зрения исследования взаимодействия указанных лигандов с ДНК и выявление его механизмов представляют важную задачу.

В данной работе проведено экспериментальное исследование полуинтеркаляционного комплекса БЭ-ДНК.

Методика эксперимента. В работе использованы сверхчистая ДНК тимуса телят, любезно предоставленная проф. Ландо (ИБОХ, Беларусь) и БЭ («Serva», Германия). Концентрации препаратов определены спектрофотометрически с применением следующих коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{260}=6400M^{-1}cm^{-1}$ для ДНК и $\epsilon_{480}=5600M^{-1}cm^{-1}$ для БЭ соответственно.

Спектрофотометрические исследования проведены на спектрофотометрах Pye Unicam-SP8-100 (Англия) и Specord M-400 (Германия), а флуориметрические измерения на флуориметре FluoroMax TM (Франция). Все измерения были выполнены в герметически закрытых кварцевых кюветах (длина оптического пути 1 см). рН-титрование было проведено на иономере – универсальном ЭВ-74 (СССР). При этом растворы ДНК и ее комплексов с лигандами титровались 0.2N HCl, всякий раз добавлялся 1 мл кислоты. Значения рН регистрировались после установления равновесия, ошибка которых варьировалась в пределах ± 0.02 единиц. Титрование раствора БЭ с ДНК проводилось микропипеткой объемом 10 мкл («Hamilton» США). Все измерения осуществлены при комнатной температуре ($t=25^{\circ}C$) при ионной силе $\mu=2.0 \cdot 10^{-2} M [Na^+]$.

Количество связанных молекул БЭ с ДНК было определено из спектров поглощения и флуоресценции БЭ и его комплексов с ДНК (см. [11]). Кривые связывания лиганда с ДНК были построены в координатах Скотгарда с помощью зависимости r/C_f от r :

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1}, \quad (1)$$

где r – число связанных с ДНК молекул лиганда, C_f – концентрация свободных молекул БЭ, K – константа связывания, n – число оснований, приходящихся на одно место связывания [2].

Результаты и обсуждение. Эффективность большинства лигандов различной природы, проявляющих биологическое действие, обусловлена непосредственным связыванием с ДНК [1, 2, 12]. При этом эти лиганды могут формировать ковалентные и нековалентные комплексы с полинуклеотидами, которые могут локально блокировать или инициировать репликацию или транскрипцию ДНК [11–13]. С другой стороны, определенный интерес представляют исследования по взаимодействию лигандов с ДНК при кислых рН, поскольку протонирование азотистых оснований может иметь существенное воздействие на структуру биополимера [14–16]. Очевидно, что протонирование приводит к изменению распределения плотности заряда оснований, которые являются местами связывания лигандов, что не может не оказывать существенного влияния на взаимодействие заряженных лигандов с ДНК. Однако в подобного рода исследованиях необходимо учитывать изменение значения константы протонирования pK_a лиганда. Известно, что pK_a аналога БЭ 3,8-диамино-6-фенилфенантридина (ДАФФ) при данной ионной силе постоянна, причем оптические характеристики этого красителя

совпадают с таковыми для БЭ как при нейтральном, так и при кислом рН. Поэтому, учитывая данный факт, мы принимаем постоянство и pK_a БЭ [17].

Исследования последних лет по взаимодействию лигандов с ДНК показывают, что БЭ, АМД, являясь стабилизаторами и взаимодействуя с дц-ДНК интеркаляционным способом, могут образовывать комплексы и с оц-ДНК [2, 3]. При этом результаты работы [7] указывают на то, что молекулы АМД частично интеркалируют в плоскость между основаниями (полуинтеркаляционный комплекс). В [2] было показано, что термодинамические характеристики взаимодействия и БЭ, и АМД с ДНК находятся в хорошем соответствии, из чего следует, что БЭ также может связываться полуинтеркаляционным механизмом с ДНК.

Для создания условий, при которых ($t=25^{\circ}\text{C}$ и $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}\text{M} [\text{Na}^+]$) ДНК находится в оц-состоянии, нами был выбран рН-индуцированный

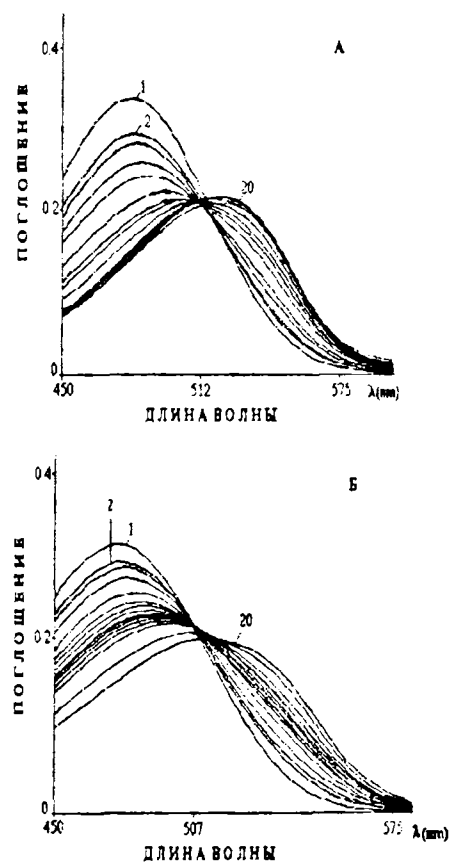


Рис. 1. Спектры поглощения чистого БЭ (1) и его комплексов с дц-ДНК (2-20) при $\lambda=400-600\text{nm}$, $\text{pH}=7.0$, $t=25^{\circ}\text{C}$, $\mu_{\text{Na}^+}=2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ (А) и с оц-ДНК (2-20) при $\lambda=400-600\text{nm}$, $\text{pH}=3.0$, $t=25^{\circ}\text{C}$, $\mu_{\text{Na}^+}=2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ (Б).

которая указывает на то, что молекулы красителя находятся в двух

переход спираль-клубок ДНК и ее комплексов с БЭ, который выявил, что при $\text{pH}=3.0$ ДНК-БЭ комплексы находятся полностью в оц-состоянии. Дальнейшие исследования комплексов БЭ с оц-ДНК проводились при указанном рН спектрофотометрическим и флуориметрическим методами. Для оценки K и n были получены кривые связывания БЭ с ДНК в координатах Скетчарда. Важно отметить, что изотермы адсорбции БЭ с дц-ДНК, полученные из спектров поглощения и приведенные на рис. 1 при $\text{pH}=7.0$, различались от таковых, полученных из спектров флуоресценции. В работе [11] показано, что БЭ, кроме флуоресцирующего интеркалирующего, образует также нефлуоресцирующий сильный комплекс с ДНК. Следовательно, можно полагать, что это отличие обусловлено нефлуоресцирующим сильным комплексом БЭ с ДНК. Более того, кривая связывания, соответствующая нефлуоресцирующему комплексу, не-

линейна (см. рис. 2, кр. 1). Это указывает на то, что БЭ связывается с ДНК, по крайней мере, двумя способами - сильным и слабым. Данный факт подтверждается наличием на спектрах поглощения изобестической точки,

состояниях – связанном и свободном. Более того, из рис. 1 видно, что при взаимодействии БЭ с дц-ДНК на спектрах поглощения обнаруживается вторая, слабо выраженная изобестическая точка, указывающая на связывание лиганда более чем одним способом (рис. 1, А). Аналогичная картина обнаруживается и при взаимодействии БЭ с оц-ДНК, что также свидетельствует о двух способах связывания (рис. 1, Б).

На рис. 2 приведены кривые связывания БЭ с дц- и оц-ДНК, полученные из спектров поглощения. Нелинейность приведенных кривых обусловлена тем, что БЭ связывается и с одной из нитей как дц-ДНК, так и с оц-ДНК, по крайней мере, двумя способами.

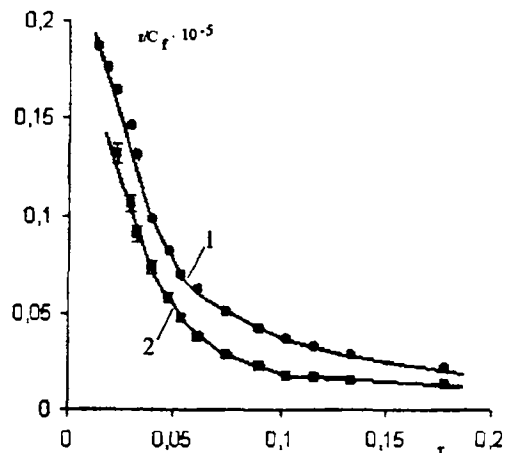


Рис. 2. Кривые связывания БЭ с дц-ДНК (1) и с оц-ДНК (2) в координатах Скетчарда.

Анализ кривых связывания БЭ с оц-ДНК выявил, что один из этих способов сильный, другой – слабый: $K_s/K_w \approx 10$, где K_s – константа связывания сильным способом, а K_w – слабым, что было предсказано в работе [2]. Значения термодинамических параметров, полученных из кривых связывания, обобщены в таблице, откуда видно соотношение значений $K_s^{nf}/K_s = 1,2$ (K_s^{nf} соответствует сильному нефлуоресцирующему комплексу БЭ-дц-ДНК, K_s – силь-

ному комплексу БЭ-оц-ДНК). Близость этих данных указывает на аналогичность этих комплексов, т. е. они имеют одинаковую природу и соответствуют полуинтеркаляционному механизму взаимодействия. На это указывают также полученные значения n , которые имеют одинаковую величину для сильных комплексов БЭ как с дц-, так и с оц-ДНК.

Значения термодинамических параметров (K и n) полуинтеркаляционных комплексов БЭ с дц- и оц-ДНК.

дц-ДНК (рН=7,0)	$K_s^{nf} = 30 \cdot 10^4 M^{-1} \pm 0.20$	$K_w = 3.7 \cdot 10^4 M^{-1} \pm 0.15$	$n_s^{nf} = 8.0$	$n_w = 3.0$
оц-ДНК (рН=3,0)	$K_s = 24 \cdot 10^4 M^{-1} \pm 0.12$	$K_w = 2.3 \cdot 10^4 M^{-1} \pm 0.16$	$n_s = 8.0$	$n_w = 3.0$

K_s^{nf} , K_s – значения K , соответствующие сильному полуинтеркалирующему комплексу БЭ с дц- и оц-ДНК соответственно; K_w – значение K , соответствующее слабому комплексу БЭ; n_s^{nf} – значение n , соответствующее сильному нефлуоресцирующему комплексу БЭ с дц-ДНК; n_s – значение n , соответствующее сильному комплексу БЭ с оц-ДНК; n_w – значение n , соответствующее слабому комплексу БЭ с дц- и оц-ДНК.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно допустить, что БЭ связывается с ДНК, кроме интеркаляционного, также полуинтеркаля-

ционным способом, при этом второй механизм взаимодействия в одинаковой мере обнаруживается как для дц-, так и для оц-ДНК. На это указывают и теоретические расчеты, которые выявили, что при определенных соотношениях концентраций БЭ/ДНК этот лиганд при взаимодействии полуинтеркаляционным способом проявляет примерно одинаковое сродство как к дц-, так и оц-ДНК ($K/K' \approx 1,1$, K – константа связывания с дц, K' – с оц участками) [2]. Совпадают и параметры связывания, соответствующие слабому способу. Следовательно, можно заключить, что БЭ может специфически связываться и с оц-участками ДНК.

Кафедра биофизики

Поступила 14.03.2003

ЛИТЕРАТУРА

1. Lane A.N, Jenkins T.C. – Quarterly Reviews of Biophysics. 2000, v. 33, № 3, p. 255–306.
2. 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.
3. 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.
4. Бабаян Ю.С., Манзини Д., Квадрифолио Ф. – Мол. биол., 1988, т. 22, № 4, с. 898–910.
5. Бабаян Ю.С., Аракелян В.Б., Потикян Г.Г., Казарян Р.С. – Биофизика, 2001, т. 46, № 6, с. 1003–1005.
6. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. – Exper. and Mol. Medicine. 2001, v. 33, № 4, p. 205–208.
7. Wadkins R.M., Jares-Erijman E.A., Klement R., Rudiger A., Jovin T.M. – J. Mol. Biol., 1996, № 262, p.53–68.
8. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дейвис Д. – Мол. биол., 1997, т. 31, с. 263–273.
9. Seanger W. Springer Verlag, New York, NY, 1984.
10. Graves D.E. – Book of Abstracts. Workshop on DNA-Drug Interactions. Madrid, 1993, 15–17 Nov., p. 39.
11. Борисова О.Ф., Щелкина А.К., Карапетян А.Т., Суровая А.Н. – Мол. биол., 1998, т. 32, № 5, с. 855–862.
12. Haroutiunian S.G., Dalian E.B., Morozov V.F., Mamasakhlisov E.Sh., Shahinyan M.S., Akhrem A.A., Lando D.Yu., Messori L., Orili P. – Inorg. Chimica Acta, 1998, № 275–276, p. 510–514.
13. Searcey M., McClean S., Madden B., McGown A.T., Wakelin P.G. – Anti-Cancer Drug Design, 1998, № 13, p. 837–855.
14. Cantor C.R., Schimmel P.R. Biophysical Chemistry, 1980, W.H. Freeman and company, New York, Book 3, 1371 p.
15. Lando D.Yu., Haroutiunian S.G., Kul'ba A.M., Dalyan Y.B., Orioli P., Mangani R., Akhrem A.A. – J. Biomol. Struct. & Dyn, 1994, v. 12, № 2, p. 355–366.
16. Сухоруков Б.И., Шварцбург П.М. – Биофизика, 1985, т. 30, с. 637–640.
17. Jones R.L., Wilson W.D. – Biopolymers, 1981, v. 20, p. 141–154.

ԿԻՍԱԻՆՏԵՐԿԱԼՅԱՑԻՈՆ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ ԱՌԱՋԱՅՈՒՄԸ ԴՆԹ-Ի
ՀԵՏ ԷԲ-Ի ԿԱՊՄԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ամփոփում

Հետազոտված են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները: Յույց է տրված, որ լիզանդի քրոմաֆորային օղակը կարող է ներդրվել երկպարույր ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկի հիմքերի հարթությունների միջև (կիսահնտերկալյացիոն կոմպլեքս): Ստացված են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կիսահնտերկալյացիոն եղանակով միացման կորերը և որոշված են փոխազդեցության պարամետրերը՝ միացման հաստատունը (K) և մեկ տեղին համապատասխանող հիմքերի թիվը (n):

Բացահայտված է, որ ԷԲ-ը կարող է փոխազդել լրիվ բնափոխված միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ, ընդ որում վերջինիս հետ լիզանդների փոխազդեցության մեխանիզմը նույնպես կիսահնտերկալյացիոն բնույթի է, իսկ միացման պարամետրերը (K և n) համընկնում են երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կիսահնտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցության դեպքում ստացված պարամետրերի հետ:

A.P. ANTONYAN, H.G. DAVTYAN, P.O. VARDEVANYAN

FORMATION OF SEMI-INTERCALATION COMPLEXES AT EtBr
INTERACTION WITH DNA

Summary

The features of EtBr complex-formation with DNA are investigated. It is shown, that the chromophore ring of ligand can be inserted into a plane between the next bases in one of strands of double-stranded (ds-DNA) (semi-intercalation complex). The binding curves by semi-intercalative interaction of EtBr with DNA are obtained and the parameters of interaction – binding constant (K) and the number of the bases (n), corresponding to one binding site, are determined.

It is revealed, that EtBr may bind with completely denatured, single-stranded (ss) DNA, thus, the mechanism of interaction of ligand with ss-DNA also has semi-intercalative character, and the binding parameters - K and n , coincide with those received at semi-intercalative interaction of EtBr with ds-DNA.