

*Биология*

УДК 577.113.6

А. Г. ДАВТЯН

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С СИНТЕТИЧЕСКИМ  
ГОМОПОЛИНУКЛЕОТИДОМ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]**

Получены кривые связывания бромистого этидия (БЭ) с двухцепочечным (дц) и одноцепочечным (оц) полинуклеотидом poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] в координатах Скетчарда. Выявлено, что БЭ с дц-poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] взаимодействует, по меньшей мере, двумя способами. Обнаружено, что БЭ образует комплексы двумя способами также с оц-poly[d(A-T)]. Получены значения  $K$  – константы связывания и  $n$  – числа оснований, приходящихся на одно место связывания для этих комплексов. Выявлено, что параметры связывания БЭ с дц- и оц-poly[d(A-T)] совпадают с таковыми, полученными для комплексов БЭ с В-ДНК.

Теоретические и экспериментальные данные указывают на то, что бромистый этидий (БЭ) может с В-ДНК образовывать несколько типов комплексов одновременно [1–3]. При этом выявлено, что с двухцепочечным (дц) ДНК этот лиганд образует, по крайней мере, три типа комплексов (интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический), а с одноцепочечным (оц) – два типа [3–7]. В работе [5] показано, что с синтетическим гомополинуклеотидом poly(dA)-poly(dT) БЭ взаимодействует кооперативно при низких температурах ( $t \leq 25^\circ\text{C}$ ), а при значениях  $t$ , соответствующих предплавлению, т. е. при значении температуры, выше которой полинуклеотид начинает плавиться ( $\approx 40^\circ\text{C}$ ), кооперативность исчезает. Структура poly(dA)-poly(dT) в водных растворах относится к В-конформационному семейству, однако имеются некоторые отличия от канонической В-формы [8]. В первую очередь, это является следствием большей гидратированности этого полинуклеотида, из-за чего малая бороздка более узкая, а молекула в целом – более жесткая, чем В-ДНК [5, 8]. Вследствие этого взаимодействие БЭ с этим полинуклеотидом носит кооперативный характер при указанных температурах.

Целью данной работы явилось сравнение термодинамических параметров взаимодействия БЭ с дц- и оц- гомополинуклеотидами poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] и poly(dA)-poly(dT).

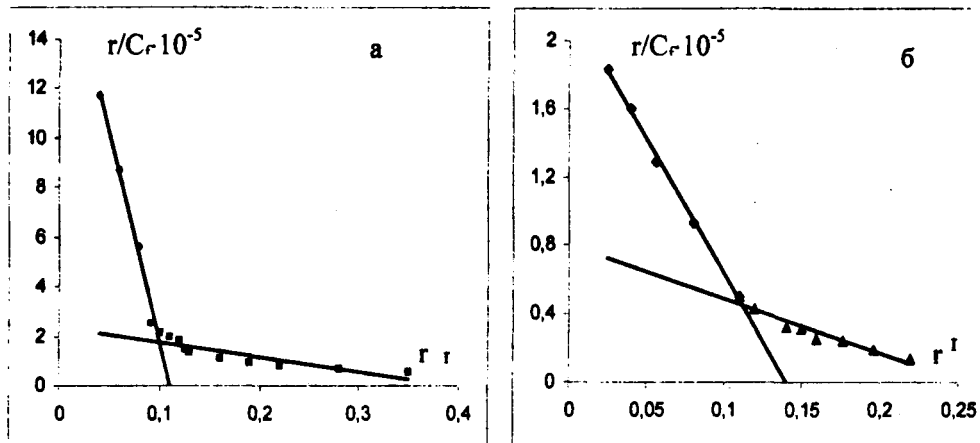
**Материалы и методы.** В работе были использованы следующие препараты: poly(dA)–poly(dT), poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] фирмы «Sigma» (США), БЭ «Serva» (Германия), 0,1 × SSC (1 × SSC – 0,15M NaCl и 0,015M Na-цитрат), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК) – 10<sup>-5</sup>M. Концентрации полинуклеотида и БЭ определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции:  $\epsilon_{260}=6000M^{-1}cm^{-1}$  для poly(dA)–poly(dT),  $\epsilon_{260}=6600M^{-1}cm^{-1}$  для poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] и  $\epsilon_{480}=5600M^{-1}cm^{-1}$  для БЭ.

Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометре *PYE Unicam-SP 8–100* (Англия). Все измерения выполнялись в герметически закрытых кварцевых кюветах с длиной оптического пути в 1см при температурах 25 и 70°C (где оба полинуклеотида в комплексе с БЭ находятся полностью в оц состоянии),  $\mu = 2,0 \cdot 10^{-2} M [Na^+]$ .

Изотермы адсорбции строили в координатах Скетчарда на основании спектров поглощения чистого БЭ и его комплексов с ДНК в интервале длины волны 400–600нм, как и описано в работах [3, 4].

**Результаты и обсуждение.** При исследовании взаимодействий БЭ с синтетическими гомополинуклеотидами poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] и poly(dA)–poly(dT), структура которых представляет собой чередование АТ и А и Т оснований в каждой из цепей, нами показано, что кооперативность не обнаруживается при poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] [9], в то время как при poly(dA)–poly(dT) кооперативность очевидна [5, 9]. Более того, кривые связывания БЭ с этим полинуклеотидом в координатах Скетчарда, приведенные на рисунке, совпадают с аналогичными кривыми, полученными при взаимодействии БЭ с ДНК [3, 9], между тем кривые связывания БЭ с poly(dA)–poly(dT) и ДНК отличаются [5]. На рисунке приведены кривые связывания БЭ с ди-poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] (а), которые нелинейны и состоят из двух прямолинейных участков, соответствующих двум типам комплексов. Из этих кривых получены термодинамические параметры (K и n) методом итерации теоретической зависимости для некооперативного связывания лигандов с ДНК [10]. Значения K и n, полученные для двух способов связывания БЭ с ди-poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)], приведены в табл. 1, из которых видно, что указанный полинуклеотид имеет структуру, характерную для В–ДНК, при этом значение K<sub>с</sub>, соответствующее интеркаляционному способу связывания, больше, чем значение K<sub>с</sub>, оцененное в работах [5, 6] для комплексов БЭ–ди-poly(dA)–poly(dT) (табл. 2). По всей вероятности, это различие обусловлено тем, что молекулы poly(dA)–poly(dT) более гидратированы по сравнению с poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] и ДНК, вследствие чего затрудняются вклинивание гидрофобного хромофора молекулы БЭ в плоскость пар оснований полинуклеотида и образование стекинг-связей с ними. Известно, что стекинг-взаимодействия стабилизируются как вандерваальсовыми, так и гидрофобными силами, поэтому интеркаляция первой молекулы лиганда приводит к нарушению гидратной оболочки, а также к раскручиванию спирали, которая меняется в структуре, и интеркаляция для других

молекул БЭ облегчается [8]. Так как poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] менее гидратирован и его структура соответствует канонической В-форме, интеркаляция молекул БЭ практически не зависит от этого фактора и кооперативность не наблюдается.



Кривые связывания БЭ с дц-poly[d(A-T)]-poly [d(A-T)] при  $t=25^\circ\text{C}$  (а) и оц-poly[d(A-T)] при  $t=70^\circ\text{C}$  (б) в координатах Скетчарда при  $\mu=2,0 \cdot 10^{-2} \text{M}$  [Na<sup>+</sup>]. Кривые состоят из двух прямолинейных участков, соответствующих двум способам связывания.

В работах [1, 4, 7] показано, что БЭ может связываться и с оц-поли-нуклеотидами, по крайней мере, двумя способами. Кривая связывания БЭ с оц-poly[d(A-T)], приведенная на рисунке (б), нелинейна; с учетом данных [1, 4, 7] анализ этой кривой проводился исходя из того, что имеют место два типа взаимодействия. Из полученной кривой определены значения параметров связывания –  $K$  и  $n$  (см. табл. 1). Величины констант  $K$ , оцененные для сильного и слабого способов связывания БЭ с дц-poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], отличаются друг от друга почти в 30 раз ( $K_s/K_w \approx 30$ ,  $K_s$  – константа связывания сильным способом,  $K_w$  – слабым). Это находится в хорошем соответствии с данными, полученными для комплексов БЭ-дц-ДНК тимуса теленка (см. [3]), в то время как для комплексов БЭ-дц-poly(dA)-poly(dT)  $K_s/K_w \approx 2$  (см. [6] и табл. 2). Этот факт также является косвенным подтверждением структурных различий дц-poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] и дц-poly(dA)-poly(dT), что приводит к разным механизмам взаимодействия с БЭ. При связывании БЭ с оц-poly[d(A-T)] и с оц-poly(dA) или poly(dT)  $K_s/K_w \approx 5-6$ , откуда видно, что в оц состоянии исчезает структурное различие между двумя полинуклеотидами, поэтому значения  $K$  и  $n$ , соответствующие обоим, совпадают, причем один из этих способов является сильным (табл. 1 и 2). Также показано, что БЭ может образовывать сильные комплексы полуинтеркаляционным механизмом с оц-ДНК. Следовательно, полагаем, сильный способ связывания БЭ с оц-poly[d(A-T)] соответствует данному механизму, так как значение  $K_s$  при этом совпадает со значением  $K$ , оцененным при полуинтеркаляционном способе взаимодействия БЭ и с ДНК, и с оц-poly(dA) или оц-poly(dT) [3, 4, 6].

Значение  $n$ , соответствующее интеркаляционному способу связывания, существенно отличается от такового, полученного для комплексов БЭ–poly(dA)–poly(dT), и совпадает с данными, полученными для БЭ ДНК, что также является следствием структурных особенностей poly(dA)–poly(dT).

Таблица 1

Значения параметров связывания  $K$  и  $n$  при взаимодействии БЭ с ди- и оц-poly[d(A-T)]

ди-poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)]			
$K_s \cdot 10^{-5}$	$K_w \cdot 10^{-5}$	$n_s$	$n_w$
40±0,08	1,33±0,35	9	3,5
оц-poly[d(A-T)]			
$K_s \cdot 10^{-5}$	$K_w \cdot 10^{-5}$	$n_s$	$n_w$
1,63±0,07	0,31±0,07	8	4

Таблица 2

Значения параметров связывания  $K$  и  $n$  при взаимодействии БЭ с ди- и оц-poly(dA)–poly(dT)

ди-poly(dA)–poly(dT)			
$K_s \cdot 10^{-5}$	$K_w \cdot 10^{-5}$	$n_s$	$n_w$
7,0±0,01	3,05±0,05	10	18
оц-poly(dA)/оц-poly(dT)			
$K_s \cdot 10^{-5}$	$K_w \cdot 10^{-5}$	$n_s$	$n_w$
1,7±0,1	0,29±0,1	8	4

$K_s$  и  $K_w$  – значения, соответствующие сильному и слабому способам связывания соответственно.

$n_s$  и  $n_w$  – числа оснований, приходящиеся на одно место связывания сильным и слабым способами соответственно.

Таким образом, вышеприведенные результаты подтверждают, что комплексообразование БЭ с ДНК зависит от пурино-пиримидинового последовательностей [8]. Более того, для обоих синтетических полинуклеотидов состоящих из однотипных оснований, выявлены существенные структурные отличия, влияющие на особенности их взаимодействия с лигандом БЭ.

Кафедра биофизики

Поступила 14.06.2003

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Karapetian A.T., Melchizian N.M., Terzibian G.A., Vardanian P.O., Antonian A.P., Vanyan O.F., Frank-Kamenetskii M.D. – J. Biol. Struct. Dynam., 1996, v. 14, № 2, p. 275–285.
2. Vardanian P.O., Antonian A.P., Manukyan G.A., Karapetian A.T. – Experimental and Molecular Medicine, 2001, v. 33, № 4, p. 205–208.
3. Vardanian P.O., Antonian A.P., Minchekyan L.A., Karapetian A.T. Some aspects of DNA-ligand interaction peculiarities. The Genome and Beyond. Structural Biology for Medicine, 2002. Advances in Rheumatology, Miami, Florida, USA, p. 17–18.

4. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. – Мол. биол., 2000, т. 34, вып. 2, с. 310–315.
5. Тищенко Е.И., Карапетян А.Т., Борисова О.Ф. – Мол. биол., 1996, т. 30, вып. 6, с. 1370–1377.
6. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суровая А.Н. – Мол. биол., 1998, т. 32, с. 855–862.
7. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. – Мол. биол., 1997, т. 31, № 2, с. 263–273.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. Под редакцией акад. Вайнштейна Б.К. М.: Мир, 1987, 584 с.
9. Антонян А.П. Мультимодалное взаимодействие лигандов с ДНК: Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Ер.: ЕГУ, 1998.
10. Бабаян Ю.С. – Биополимеры и клетка, 1989, т. 5, № 3, с. 79–82.

#### Հ. Գ. ԴԱՎԹՅԱՆ

### Poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] ՄԻՆԹԵՏԻԿ ՀՈՍՈՊՈԼԻՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴԻ ՀԵՏ ԷԹԻԴԻՈՒՄԲՐՈՄԻԴԻ ՓՈՆԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

#### Ամփոփում

Ստացվել են երկշղթա և միաշղթա poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] պոլինուկլեոտիդի հետ էթիդիումբրոմիդի (ԷԲ) փոխազդեցության կորերը Սկետչարդի կոորդինատներով: Պարզվել է, որ երկշղթա poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)]-ի հետ ԷԲ-ը փոխազդում է առնվազն երկու եղանակով: Հայտնաբերվել է, որ ԷԲ-ը միաշղթա poly[d(A-T)]-ի հետ ևս արաջացնում է կոմպլեքսներ երկու եղանակով: Ստացվել են K-ի կապման հաստատունի և n-ի կապման տեղին համապատասխանող հիմքերի քվի արժեքները: Պարզվել է, որ ԷԲ-ի հետ երկշղթա և միաշղթա poly[d(A-T)]-ի կապման պարամետրերը համընկնում են ԷԲ–B–ԴՆԹ կոմպլեքսների համար ստացված պարամետրերի հետ:

H. G. DAVTYAN

### INTERACTION OF ETIDIUM BROMIDE WITH SYNTHETIC HOMOPOLINUCLEOTIDE poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)]

#### Summary

Curves of Etidium Bromide binding with single- and double stranded polynucleotide poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] were obtained in Scatchard coordinates. It was revealed that EtBr binds to double stranded poly[d(A-T)]–poly[d(A-T)] in two ways. Furthermore, EtBr may form two type complexes with one stranded poly[d(A-T)]. Values of K – binding constant and n – number site size for these complexes were obtained. Parameters of EtBr binding with single stranded and double stranded polynucleotide poly[d(A-T)] coincide with those for EtBr–B–DNA complexes