



# Структура и функция биополимеров

УДК 575.117.577.34

А. И. Драган, С. Н. Храпунов

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КВАНТОВЫХ ВЫХОДОВ ФОТОРАЗРЕЗАНИЯ ДНК ЛАЗЕРОМ В ПРИСУТСТВИИ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО И НЕИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ХРОМОФОРОВ

*Изучали эффекты фоторазрезания ДНК в присутствии бромистого этидия (ЕВ) и рибофлавина (RF). Облучение ДНК УФ-лазером (337 нм) с интенсивностью в импульсе  $55 \text{ кВт/см}^2$  в присутствии ЕВ или RF приводит к возникновению одно- и двуничатых разрывов в суперспирализованной форме ДНК плазмиды pBR322. Определены квантовые выходы фоторазрезания ДНК, равные  $0,6 \cdot 10^{-5}$  (в присутствии ЕВ) и  $3,5 \cdot 10^{-5}$  (в присутствии RF).*

**Введение.** Действию лазерного излучения на биомолекулы (белки ДНК) клетки уделяется большое внимание в связи с его мутагенным эффектом, возможностью направленно воздействовать на определенные сайты ДНК и генома клеток [1—3]. Мутагенный эффект лазерного излучения может быть обусловлен как прямым действием излучения на молекулу ДНК, так и опосредованно: через нарушения систем ферментативной репарации или путем передачи энергии с донора (хромофор) на акцептор (ДНК). Теоретически проблема лазерного фоторазрезания ДНК, зависящего от нелинейных эффектов, возникающих в системе ДНК — хромофор, рассмотрена в работе [4]. При этом исследовали лишь синтетические красители-интеркаляторы, которые в результате взаимодействия с ДНК по интеркаляционному типу образуют «плотный» контакт между хромофором — донором энергии и ДНК-акцептором, что обеспечивает высокую эффективность миграции энергии с хромофора на ДНК. В то же время представляет интерес изучение возможностей фотодегradации ДНК природными соединениями-хромофорами, не обладающими мутагенными свойствами. Отличительной чертой многих природных хромофоров (витамины, коферменты и т. п.) в сравнении с синтетическими является отсутствие способности интеркалировать в ДНК. Проблемы передачи энергии с хромофора-донора, неспособного к интеркаляции, на ДНК с последующим ее фоторазрезанием остаются неизученными.

В данной работе, используя анализ возникающих одно- и двуничатых разрывов в циркулярно замкнутой ДНК плазмиды pBR322, исследованы характеристики и определены параметры фоторазрезания ДНК азотным лазером (337 нм) в присутствии бромистого этидия (ЕВ, типичный интеркалятор) и рибофлавина (RF), неспособного интеркалировать в ДНК. RF (витамин В<sub>2</sub>) является естественным компонентом клетки, в частности, входит в состав ферментов фотореактивации поврежденной ДНК [5].

**Материалы и методы.** В работе использовали: ЕВ («Sigma», США), RF, агарозу («Chemapol», ЧСФР), ДНК pBR322 (НПО «БИОИОЛ»).

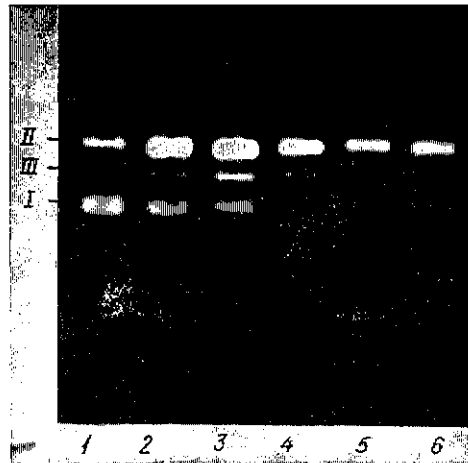
© А. И. Драган, С. Н. Храпунов, 1993

Концентрацию EB, RF и ДНК определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции:  $E_{480} = 5600$ ,  $E_{455} = 11300$  и  $E_{260} = 7050 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  соответственно. Концентрация ДНК *pBR322* в опытах была равна  $6 \cdot 10^{-4}$  или  $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ; RF —  $0,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ; EB —  $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

Электрофорез ДНК проводили в 0,7 %-м агарозном геле в буфере: 40 мМ трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0. Электрофореграммы анализировали на спектрофлюориметре «Алюмин-2М», оборудованном приставкой для сканирования гелей и фотооттисков.

Препараты облучали импульсным азотным лазером ЛГИ-21 (частота следования импульсов 100 Гц, длительность импульса 10 нс, энергия импульса 39 мкДж, длина волны генерации 337 нм) в планшетах из оргстекла. Плотность мощности облучения контролировали с помощью неселективного пироэлектрического приемника излучения (НППИ) (Ин-т физики АН Украины).

Рис. 1. Расщепление ДНК *pBR322* лазерным излучением: I — ДНК *pBR322* в 0,03 мМ растворе EB, необлученная лазером (контроль); 2–6 — ДНК (0,3 мМ) в присутствии EB (0,03 мМ), облученная азотным лазером. Время облучения (мин): 2 — 10; 3 — 30; 4 — 60; 5 — 120; 6 — 180 (I — суперспирализованная форма ДНК *pBR322*, II — релаксированная, содержащая один или более однонитчатых разрывов, III — линейная форма ДНК).



**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены результаты электрофореза ДНК *pBR322*, облученной в присутствии EB с различной экспозиционной дозой. Увеличение времени облучения уменьшает долю суперспирализованной формы I ДНК в результате возникновения одно- (ОР) и двунитчатых (ДР) разрывов в молекуле ДНК. Одновременно с уменьшением доли формы I ДНК доля релаксированной формы II ДНК сначала увеличивается, а затем уменьшается в результате появления ДР.

Такие же эксперименты были проведены по облучению лазером комплексов ДНК плазмиды *pBR322* с RF.

Для определения зависимости доли суперспирализованных молекул ДНК (без ОР) от среднего числа ОР, приходящихся на одну стандартную молекулу ДНК *pBR322* ( $x_1$ ), использовали распределение Пуассона. При этом предполагалось, что ОР распределяются по молекуле ДНК случайно и их среднее количество на молекулу ДНК *pBR322* (4400 п. о.) не превышает тысячной доли общего числа возможных разрывов. Тогда, согласно закону Пуассона, доля молекул с  $r$  ОР связана со средним количеством ОР на молекулу ДНК *pBR322* следующим образом:

$$P_r = (x_1^r / r!) \cdot e^{-x_1}. \quad (1)$$

Исходя из уравнения (1) доля молекул с  $r=0$ , т. е. доля суперспирализованной формы ДНК *pBR322*, зависит от среднего количества ( $x_1$ ) ОР экспоненциально:

$$P_{sc} = \exp(-x_1). \quad (2)$$

При этом изменение доли суперспирализованной ДНК ( $P_{sc}$ ) определяли, измеряя площадь соответствующего пика на денситограммах (см. рис. 1). Полученные данные представлены на рис. 2. Количественный анализ зависимости ОР от дозы лазерного излучения позволил оп-

редсчитать скорости возникновения ОР  $x_1/t$ , равные 0,6 и 0,08 мин<sup>-1</sup> для комплексов ДНК с ЕВ и RF соответственно. Скорость образования разрывов в ДНК связана с квантовым выходом ( $Q$ ) разрывов следующим соотношением [2]:

$$x_1/t = N_{ch} \cdot \sigma_a \cdot I \cdot Q, \quad (3)$$

где  $N_{ch}$  — количество хромофоров на молекулу, определенное на основании константы ассоциации ЕВ с ДНК  $K_a = 3 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup> [4];  $I$  — сред-

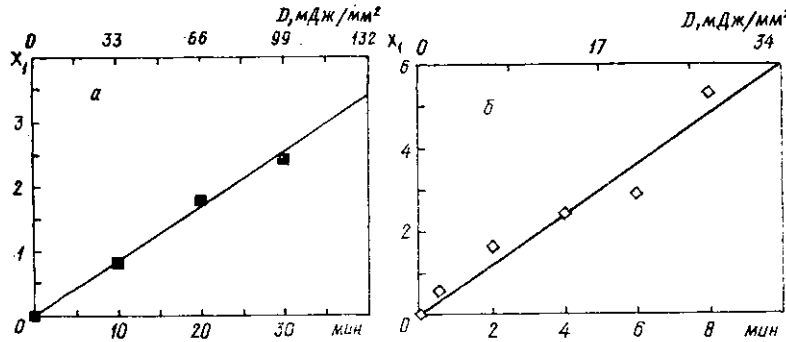


Рис. 2. Зависимость среднего количества однонитчатых разрывов ( $x_1$ ), приходящихся на одну молекулу ДНК плазмиды *pBR322*, от дозы лазерного облучения в присутствии: а — ЕВ ( $3 \cdot 10^{-5}$  М); б — RF ( $0,8 \cdot 10^{-4}$  М)

няя интенсивность излучения лазера;  $\sigma_a = 5 \cdot 10^{-17}$  см<sup>2</sup> [2] — сечение поглощения при длине волны генерации лазера.

Из уравнения [3] квантовый выход фоторазрезания ДНК  $Q = (0,6 \pm 0,23 \cdot 10^{-5})$ .

Полученное нами значение примерно в 3 раза меньше  $Q$ , определенного в работе [4] при интенсивности излучения азотного лазера 150 мВт/см<sup>2</sup>. Меньшее значение  $Q$  в нашем случае, по-видимому, обусловлено нелинейным механизмом возбуждения хромофора, поскольку мы использовали меньшую, нежели в работе [4], интенсивность УФ-облучения (55 кВт/см<sup>2</sup>).

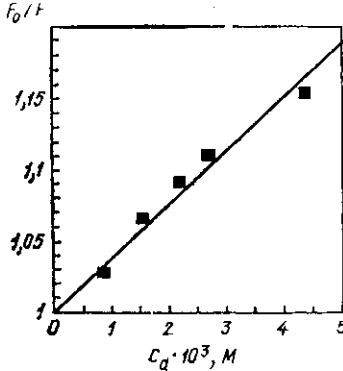


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции RF в комплексе с ДНК.  $F_0$ ,  $F$  — интенсивность флуоресценции RF в отсутствие ДНК и при данной концентрации ДНК соответственно;  $C_d$ ,  $M$  — концентрация ДНК (моль фосфатов/л). Длина волны возбуждения 480 нм; регистрации флуоресценции — 550 нм

Для анализа действия лазерного излучения на ДНК в комплексе с хромофором необходимо знать константу ассоциации ( $K_a$ ) красителя с ДНК. Мы определили  $K$  RF флуоресцентным методом, считая, что при взаимодействии с ДНК (азотистыми основаниями ДНК) происходит полное тушение флуоресценции RF [5, 6]. Исследуя тушение флуоресценции при титровании RF раствором ДНК, можно оценить константу ассоциации ( $K_a$ ) RF с ДНК по формуле [5]:

$$K_a = v/(1 - v) \cdot C_d^f, \quad (4)$$

где  $v = (F_0 - F)/F_0$  — доля связанных молекул RF;  $F$  — интенсивность его флуоресценции в отсутствие ДНК;  $C_d^f = C_d - v \cdot C_r$  — концентрация свободной ДНК в растворе;  $C_d$  и  $C_r$  — концентрации ДНК и RF в растворе. В случае, когда  $C_d \gg v \cdot C_r$ ,  $C_d^f \approx C_d$ , что отвечает условиям наших измерений, уравнение (4) преобразуется следующим образом:

$$F_0/F = 1 + K_a \cdot C_d. \quad (5)$$

На рис. 3 представлена зависимость флюоресценции RF ( $F_0/F$ ) от концентрации ДНК. Из наклона графика в соответствии с уравнением (5) находим  $K_a = 38,2 \pm 0,9 \text{ M}^{-1}$ .

Полученная  $K_a$  близка к значениям  $K_a$  для низкомолекулярных комплексов RF с изолированными азотистыми основаниями и нуклеотидами [5, 6], что свидетельствует о незначительном вкладе эффекта интеркаляции во взаимодействие RF с ДНК.

Пользуясь выражением (3), считая сечение поглощения равным  $1,8 \cdot 10^{-17} \text{ см}^2$  и константу ассоциации  $K = 38,2 \pm 0,9 \text{ M}^{-1}$ , можно определить выход ОР в ДНК:  $Q = (3,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ .

Сравнение квантовых выходов ОР для EB и RF, полученных в данной работе, показывает, что RF является более эффективным индуктором ОР в ДНК, несмотря на то, что условия для переноса энергии на ДНК, по-видимому, хуже (отсутствие «тесного» контакта между хромофором-донором и акцепторами, наблюдающееся при интеркаляции в ДНК). Флавиновый хромофор в окисленной форме высокоэлектрофилен [7] и в возбужденном состоянии в присутствии доноров электронов способен захватывать электрон и восстанавливаться [5, 6]. Изучение взаимодействия RF с пуринами и пиримидинами [5—7], а также проведенные нами исследования взаимодействия его с ДНК показывают, что комплексообразование RF с азотистыми основаниями и ДНК обусловлено переносом заряда на RF в основном состоянии. Можно предположить, что при переносе двухквантового возбуждения RF на фосфодиэфирные связи и азотистые основания ДНК эффект повреждения последней усиливается за счет акцепции электрона молекулой RF и продуцирования радикальных состояний в ДНК.

**Резюме.** Вивчали ефекти фоторозривання ДНК у присутності бромистого етидію (EB) та рибофлавіну (RF). Опромінення ДНК УФ-лазером (337 нм) з інтенсивністю в імпульсі  $55 \text{ кВт/см}^2$  за умови присутності EB або RF призводить до виникнення одно- та двонитчастих розривів у суперспіралізованій формі ДНК плазміді *pBR322*. Визначено квантові виходи фоторозривання ДНК, що дорівнюють  $0,6 \cdot 10^{-5}$  (у разі EB) та  $3,6 \cdot 10^{-5}$  (у випадку RF).

**Summary.** Effects of DNA photocleavage in presence of ethidium bromide (EB) and riboflavin (RF) was studied. Irradiation of DNA by UV-laser (337 nm) with pulse intensity  $55 \text{ kW/cm}^2$  in presence of EB or RF induce single- and double-strand breaks in supercoiled form of *pBR322* DNA. Quantum yields of DNA photocleavage were equal to  $0,6 \cdot 10^{-5}$  for EB solution and  $3,6 \cdot 10^{-5}$  for RF solution.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Драган А. И., Храпунов С. Н. Изучение мутагенного действия лазерного излучения у *A. fistulosum* // Цитология и генетика.— 1992.— № 3.— С. 32—36.
2. Бенимецкая С. Ю., Козионов А. Л., Муратов Л. С. и др. Нелинейная лазерная фотомодификация нуклеиновых кислот, индуцированная интеркалирующими красителями // Биофизика.— 1987.— 32.— С. 716—731.
3. Драган А. И., Храпунов С. Н. О механизмах цитогенетического действия лазерного излучения // Цитология и генетика.— 1993.— 27, № 4.
4. LePecq J.-B., Paoletti C. Fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids // J. Mol. Biol.— 1967.— 27.— P. 87—106.
5. Tsibris J. C. M., McCormick D. B., Wright L. D. Studies on the donor-acceptor complexes relating to the intra molecular association of the riboflavin and adenosine moieties of flavin adenine dinucleotide // Biochemistry.— 1965.— 4, N 3.— P. 504—510.
6. Weber G. Fluorescence of riboflavin and flavin adenine dinucleotide // Biochem.— J.— 1950.— 47, N 1.— P. 114—121.
7. Слифкин М. Взаимодействия с переносом заряда в пуринах и пиримидинах // Физико-химические свойства нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1976.— С. 77—110.

Киев, ун-т им. Т. Г. Шевченко

Получено 03.11.92