



УДК 577.152.314 : 547.963.32

НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ДНК,  
ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ ДИСТАМИЦИНА А  
И ПРОИЗВОДНЫХ АКРИДИНА*Яшина Л. Н., Пономарева Т. А., Речкунова Н. И.,  
Зиновьев В. В., Малыгин Э. Г., Шибнев В. А.\***Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
пос. Кольцово Новосибирской обл.;**\* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Изучена специфичность связывания красителей с ДНК. Наиболее сильное связывание антибиотика дистамицина А наблюдается в участках ДНК, содержащих не менее трех рядом расположенных А·Т-пар. Красители акрихин и 7-аминоакрихин являются слабоспецифичными ингибиторами с преимущественным связыванием в А·Т-областях.

В настоящее время показано, что антибиотики имеют предпочтительные участки связывания с ДНК. Так, для актиномицина D установлено, что он предпочтительно взаимодействует с двухцепочечной ДНК по последовательностям GC [1—3]. В то же время для дистамицина А наблюдается предпочтительное связывание с А·Т-богатыми областями ДНК с защитой 4 пар оснований [4]. Однако неизвестно, какое минимальное число А·Т-пар является достаточным для прочного связывания антибиотика и имеет ли значение последовательность нуклеотидов. Краситель акридиновый оранжевый связывается с ДНК неспецифически [5], хотя ряд его производных проявляет А·Т-специфичность. Так, было показано, что 2—3% пар оснований ДНК — сайты прочного связывания профлавина, тогда как константа связывания для остальных сайтов в 2—3 раза меньше. Сайты прочного связывания соответствуют А·Т-богатым областям ДНК [6]. Комплексы двух типов существуют и для аминокридинов, константы связывания акрифлавина для сайтов прочного и слабого связывания различаются в 6 раз [7]. Акрихин и 7-аминоакрихин являются производными акридинового ряда, и их специфичность ранее не исследовалась.

В присутствии антибиотиков наблюдается ингибирование расщепления участков узнавания ДНК эндонуклеазами рестрикции, эффективность которого для разных участков зависит от концентрации антибиотиков [8—11]. Это можно объяснить структурными особенностями прилегающих к последовательности узнавания участков ДНК, сравнение которых позволяет установить нуклеотидные последовательности, предпочтительные для связывания ингибиторов.

В настоящей работе для определения предпочтительных участков связывания антибиотика дистамицина А и красителей аминокрихина и 7-аминоакрихина была проанализирована структура окружения участков узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRI*, *BamHI*, *BglII* на ДНК  $\lambda$ cI857. Для определения заблокированных сайтов сравнивали электрофореграммы фрагментов гидролиза исследуемых рестриктаз без ингибитора и в присутствии ингибитора, аналогично работе [8]. Карта расщепления молекулы ДНК  $\lambda$ cI857 с известной первичной структурой ферментами *EcoRI*, *BamHI*, *BglII* приведена на рис. 1. Положения участков узнавания каждой рестриктазы на ДНК  $\lambda$ cI857 определяли по первичной структуре, используя программу поиска сайтов рестриктаз [12]. Из рис. 1 видно, что использованная ДНК содержит 5—6 участков гидролиза каждой рестриктазой, что удобно для анализа последовательности их блокирования.

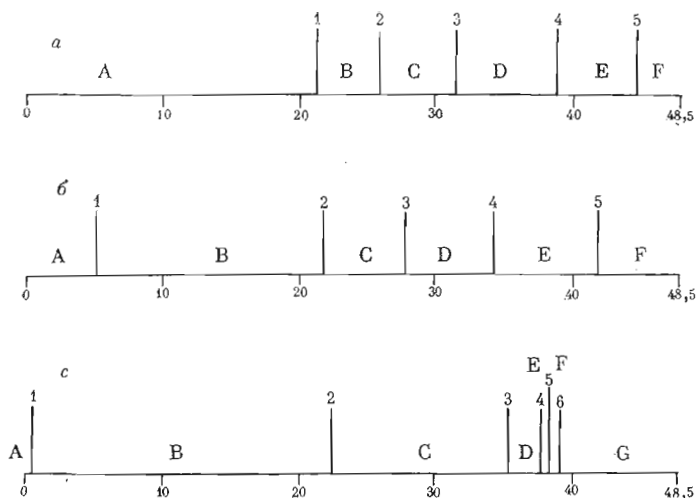


Рис. 1. Карты расщепления ДНК фага  $\lambda$ I857 рестрикционными эндонуклеазами *EcoRI* (а), *BamHI* (б), *BglII* (в). Буквами обозначены фрагменты гидролиза; цифры сверху — номера участков узнавания, цифры снизу — позиции на ДНК  $\lambda$ I857 в тыс. н.п.

На рис. 2 представлены электрофореграммы фрагментов гидролиза ДНК  $\lambda$ I857 рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* в присутствии возрастающих концентраций дистамицина А. Из рис. 2а видно, что при концентрации дистамицина А, равной  $1 \cdot 10^{-5}$  М (соответствующее соотношение  $2D/P = 0,13$ , где  $D$  — молярная концентрация антибиотика,  $P/2$  — концентрация ДНК, выраженная в молярной концентрации пар оснований), для рестриктазы *EcoRI* остается один исходный фрагмент А и появляются укрупненные фрагменты ВСД и ЕФ, что соответствует блокированию участков узнавания 2, 3 и 5. При повышении концентрации антибиотика ( $2D/P = 0,64$ ) блокируются участки 1 и 4. Обнаруженная последовательность защиты участков узнавания фермента в целом соответствует данным работ [8—11], хотя у нас не было получено существенного различия в последова-

Таблица 1

Блокированные сайты гидролиза рестриктаз *EcoRI*, *BamHI*, *BglII* на ДНК фага  $\lambda$ I857 в присутствии дистамицина А  
Номера сайтов соответствуют рис. 1

Эндонуклеаза рестрикции	Концентрация ( $2D/P$ )	Номер заблокированного сайта	Окружение заблокированных сайтов
<i>EcoRI</i>	0,32	2 3 5	<u>GAAAT</u> (GAATTC) <u>TAAGC</u> GAAGT(GAATTC) <u>AAACA</u> GTCCT(GAATTC) <u>ATTAG</u>
	0,64	Все	
<i>BamHI</i>	0,32	1*	<u>TATGG</u> (GGATCC)TCAAC
	0,52	4*	<u>GAAAT</u> (GGATCC)ACTCG
	6,4	1,4 Все	
<i>BglII</i>	0,32	3	GTGAG(AGATCT) <u>GAATT</u>
	0,52	3,2*	GCTGC(AGATCT) <u>GGAAA</u>
	0,64	Все	

\* Частично заблокированные сайты.

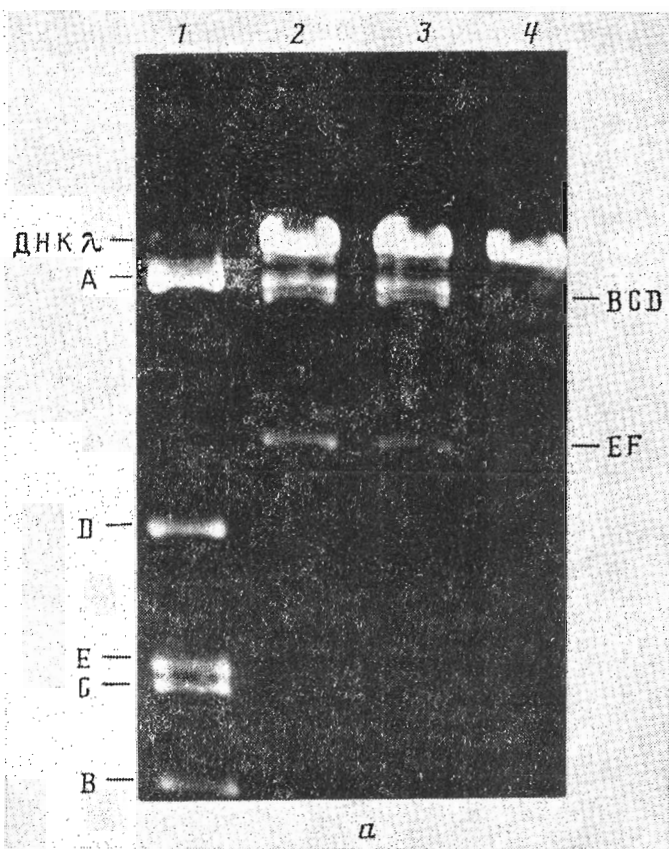


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов гидролиза ДНК фага  $\lambda$ I857 эндонуклеазами *EcoRI* (а) и *BamHI* (б) в присутствии дистамицина А. Буквы слева относятся к фрагментам полного гидролиза ДНК без ингибитора (дорожка 1), справа — к укрупненным фрагментам в присутствии ингибитора. Концентрация дистамицина А в реакционной смеси соответствует соотношению 2D/P: а) 2 — 0,13; 3 — 0,26; 4 — 0,64; б) 2 — 0,13; 3 — 0,32; 4 — 0,52; 5 — 0,64; 6 — 0,91; 7 — 1,6; 8 — 3,2; 9 — 6,4. Обозначения фрагментов соответствуют рис. 1.

тельности блокирования участков 2, 3 и 5. Для рестриктазы *BamHI* в первую очередь блокируются участки 1 и 4 ( $2D/P = 0,52$ ), затем все остальные (рис. 2б). Аналогичные исследования, выполненные с рестриктазой *BglIII*, показали, что наиболее эффективно блокируются участки 3 и 2. Мы проанализировали окружение всех выявленных участков гидролиза, которые блокировались дистамицином А в первую очередь (табл. 1): в окрестности рассмотренных сайтов содержатся области длиной более трех А·Т-пар (эти области подчеркнуты); для рестриктазы *EcoRI* связывание антибиотика происходит одинаково эффективно с последовательностями, содержащими четыре А·Т-пары (окружение участков 2 и 5) и три А·Т-пары (окружение участка 3), так как эти участки блокируются при одинаковой концентрации дистамицина А. Последовательности нуклеотидов в этих А·Т-областях различаются.

Далее мы проанализировали нуклеотидный состав участков ДНК, прилегающих к устойчивым для блокирования сайтам узнавания исследованных рестриктаз (табл. 2): для всех рестриктаз наблюдается преимущественное содержание G·С-пар в окрестностях участка узнавания и отсутствуют области длиной более двух А·Т-пар.

Проведенный анализ показывает, что нуклеотидная последовательность не существенна для связывания дистамицина А, определяющим фактором является число А·Т-пар. Наиболее сильное связывание антибиотика наблюдается для областей, содержащих не менее трех А·Т-пар. Это свойство антибиотика может быть использовано для избирательного блокирования

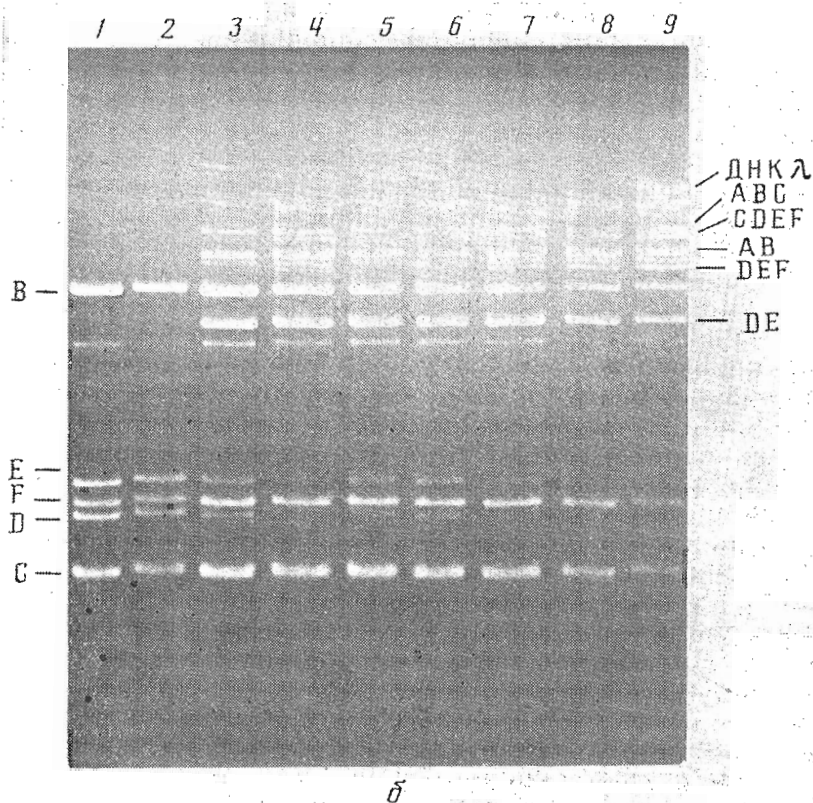


Рис. 26

тех участков узнавания рестриктаз, к которым примыкают три и более А·Т-пар.

Предложенный в работе метод определения предпочтительных участков связывания ингибиторов был применен для определения специфичности красителей акрихина и 7-аминоакрихина. Нами было исследовано влияние акрихина и 7-аминоакрихина на гидролиз ДНК  $\lambda$ с1857 рестриктазами *EcoRI*, *BamHI*, *BglII*. Электрофоретическое разделение фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК  $\lambda$ с1857 рестриктазой *EcoRI* в присутствии акрихина и 7-аминоакрихина (рис. 3), показало, что при концентрации 7-аминоакрихина, соответствующей  $2D/P = 3,2$ , происходит частичная блокировка сайта 3 и полная блокировка сайтов 2 и 5, при повышении концентрации красителей ( $2D/P = 6,4$ ) блокируется сайт 3.

Таблица 2

Сайты рестриктаз *EcoRI*, *BamHI*, *BglII* на ДНК  $\lambda$ с1857, устойчивые к блокированию дистамцином А. Номера сайтов соответствуют рис. 1

Эндонуклеаза рестрикции	Концентрация ( $2D/P$ )	Номер сайта	Окружение неблокируемых сайтов
<i>EcoRI</i>	0,32	1	GGTGA (GAATTC)GGCCT
		4	TCAGA (GAATTC)TGGCG
<i>BamHI</i>	3,2	2	GTTCC (GGATCC)GGGAG
		3	TAGGC (GGATCC)CCTTC
		5	TCACG (GGATCC)CATGT
<i>BglII</i>	0,32	1	GAGGC (AGATCT)CCAGC
		6	GGCGC (AGATCT)GACCA

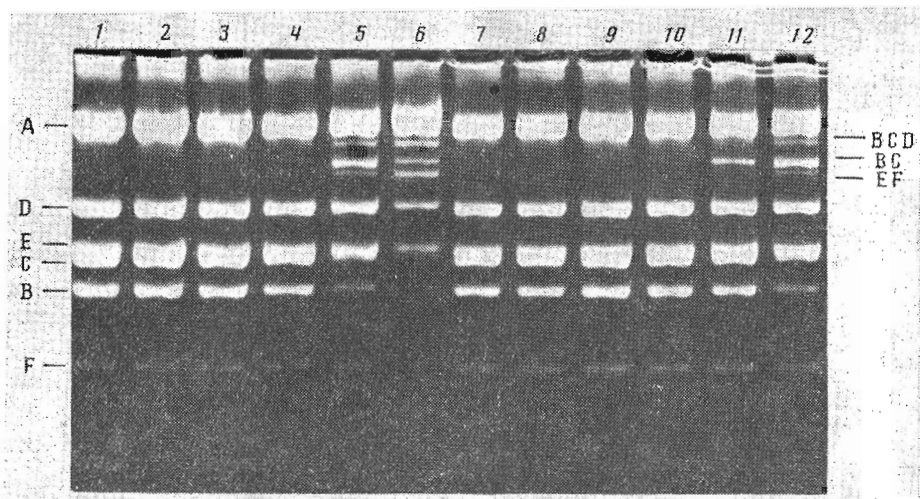


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК  $\lambda$ I857 эндонуклеазой *EcoRI* в присутствии 7-аминоакрихина (1—6) и акрихина (7—12). Буквы слева относятся к фрагментам *EcoRI*-гидролизата без ингибитора, справа — к укрупненным фрагментам в присутствии красителей. Обозначения фрагментов соответствуют рис. 1а. Концентрации красителей в реакционной смеси соответствуют соотношению 2D/P для 7-аминоакрихина: 1 — 0; 2 — 0,032; 3 — 0,064; 4 — 0,64; 5 — 3,2; 6 — 6,4; для акрихина: 7 — 0; 8 — 0,032; 9 — 0,064; 10 — 0,64; 11 — 3,2; 12 — 6,4

Таким образом, использование акрихина и 7-аминоакрихина в качестве ингибитора действия рестриктазы *EcoRI* приводит к эффективному блокированию тех же участков на ДНК  $\lambda$ I857, что и в случае использования дистамицина А. Аналогичный результат был получен при исследовании блокирования рестриктазы *BglII*: в первую очередь блокируются участки узнавания 2 и 3. Для рестриктазы *BamHI* последовательности блокирования сайтов в присутствии красителей и дистамицина А различаются. Рис. 4 представляет гидролиз ДНК  $\lambda$ I857 рестриктазой *BamHI*. Анализ появления новых фрагментов гидролиза, в частности фрагмента АВ на дорожке 2, говорит о том, что в первую очередь происходит блокирование сайта 1. При дальнейшем увеличении концентрации красителя (рис. 4, дорожка 3) появляются фрагменты DE, DEF, CDEF. В этом случае блокированы участки 3 и 5. В отличие от дистамицина А добавление красителей приводит дополнительно к блокированию участков 3 и 5. Полученные данные представлены в табл. 3, из которой видно, что для рестриктазы *BamHI*

Таблица 3

Блокированные сайты гидролиза рестриктаз *EcoRI*, *BamHI* и *BglII* на ДНК фага  $\lambda$ I857 в присутствии 7-аминоакрихина

Рестриктаза	Концентрация (2D/P)	Номер сайта	Окружение блокированных сайтов
<i>EcoRI</i>	6,4	2	CAAAT(GAATTC)TAAGC
		3	GAAGT(GAATTC)AAACA
		5	GTCC(TGAATTC)ATTAG
<i>BamHI</i>	0,64	1	TATGG(GGATCC)TCAAC
		3	TAGGC(GGATCC)CCTTC
		4	GAAAT(GGATCC)ACTCG
		5	TCACG(GGATCC)CATGT
<i>BglII</i>	0,13	2	GCTGC(AGATCT)GGAAA
	0,52	3	GTGAG(AGATCT)GAATT
		Все	

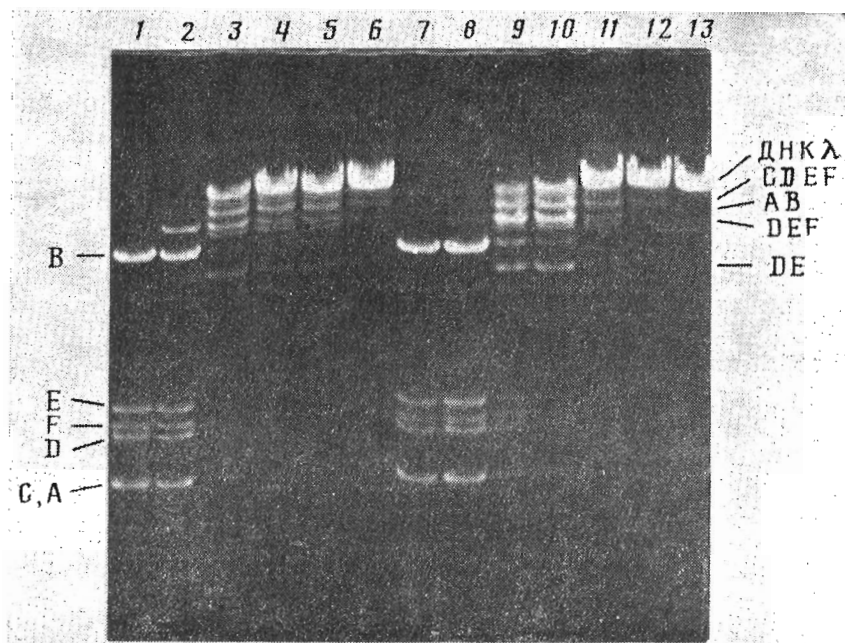


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК  $\lambda$ CI857 эндонуклеазой *Bam*HI в присутствии 7-аминоакрихина (1–6) и акрихина (7–12). Буквы слева относятся к фрагментам *Bam*HI-гидролизата без ингибитора, справа — к укрупненным фрагментам в присутствии красителей. Обозначения фрагментов соответствуют рис. 1б. Концентрации красителей в реакционной смеси соответствуют соотношению  $2D/P$  для 7-аминоакрихина: 1 — 0; 2 — 0,26; 3 — 0,64; 4 — 0,96; 5 — 1,3; 6 — 2,6; для акрихина: 7 — 0; 8 — 0,26; 9 — 0,64; 10 — 0,96; 11 — 1,3; 12 — 2,6; 13 — исходная ДНК  $\lambda$ CI857

в окружении участков 3 и 5 имеется только две А·Т-пары. Так как нет существенного различия в эффективности блокирования участков 3 и 5 рестриктазы *Bam*III, можно предположить, что для связывания акрихина и 7-аминоакрихина достаточно двух А·Т-пар.

В участках узнавания исследованных нами рестриктаз *Eco*RI, *Bam*HI, *Bgl*II содержится не менее двух рядом расположенных А·Т-пар, что позволяет добиться полного ингибирования при более высокой концентрации красителей. Такие А·Т-последовательности отсутствуют как в участке узнавания рестриктазы *Pst*I, так и в окружении нескольких участков узнавания *Pst*I на ДНК  $\lambda$ CI857. Нами показано, что при использовании концентрации 7-аминоакрихина, соответствующей  $2D/P = 3,2$ , происходит полное блокирование участков узнавания *Pst*I на ДНК  $\lambda$ CI857. В этом случае происходит связывание красителя либо с одной А·Т-парой, либо неспецифически — по-видимому, со слабыми сайтами связывания.

Константа связывания с ДНК 7-аминоакрихина выше, чем у акрихина, так как для получения одинакового ингибирующего эффекта необходимо использовать более высокие концентрации акрихина: концентрация 7-аминоакрихина, равная  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М, дает такую же картину блокирования, как и концентрация акрихина, равная  $5 \cdot 10^{-4}$  М (см. рис. 4, дорожки 5 и 12).

Мы показали, что исследованные красители, так же как и антибиотики, являются ингибиторами действия рестриктаз. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что акрихин и 7-аминоакрихин — слабоспецифичные ингибиторы с преимущественным связыванием с А·Т-областями ДНК.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали препараты эндонуклеаз рестрикции *Eco*RI — 20 ед. акт./мкл; *Bam*HI — 15 ед. акт./мкл; *Pst*I — 20 ед. акт./мкл; *Bgl*II — 1 ед. акт./мкл. Реакционная смесь содержала 1 мкг ДНК  $\lambda$ CI857, 3–5 ед.

акт. ферментов в буфере соответственно: *EcoRI* — 0,1 М трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl; *BamHI* — 6 мМ трис-НСl (рН 7,4), 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl, 6 мМ β-меркаптоэтанол; *PstI* — 0,1 М трис-НСl Е(рН 7,5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 7 мМ β-меркаптоэтанол; *BglII* — 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 М NaCl. Концентрации ингибиторов в реакционной смеси составили: дистамицина А — 10<sup>-5</sup>—2·10<sup>-4</sup> М; акрихина и 7-аминоакрихина [13] — 5·10<sup>-7</sup>—5·10<sup>-4</sup> М для *EcoRI* и 10<sup>-5</sup>—2·10<sup>-4</sup> М для *BamHI*. Объем проб 20 мкл.

Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37° С. Реакцию останавливали, добавляя к каждой пробе по 2 мкл 10 мМ EDTA и до 2% додецилсульфата натрия. Анализ проб проводили электрофоретически в 1% агарозном геле [14].

Препарат дистамицина А был любезно предоставлен Б. П. Готтихом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Müller W., Crothers D. M. J. Mol. Biol., 1958, v. 35, № 2, p. 251—290.
2. Jain S. C., Sobell H. M. J. Mol. Biol., 1972, v. 68, № 1, p. 21—34.
3. Wells R. D., Larson J. E. J. Mol. Biol., 1970, v. 49, № 2, p. 319—342.
4. Zimmer Ch., Reinert K. E., Luck G., Wärtert V., Löber G., Thrum H. J. Mol. Biol., 1971, v. 58, № 1, p. 329—348.
5. Georghiou S. Photochem. and Photobiol., 1977, v. 26, № 1, p. 59—68.
6. Thomes J. C., Weill G., Daune M. Biopolymers, 1969, v. 8, № 5, p. 647—659.
7. Blake A., Peacocke A. R. Biopolymers, 1968, v. 6, № 9, p. 1225—1230.
8. Поляновский О. Л., Карлышев А. В., Брага Э. А., Носиков В. В. Докл. АН СССР, 1976, т. 229, № 2, с. 500—503.
9. Nosikov V. V., Sain B. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 7, p. 2263—2273.
10. Goppelt M., Langowski J., Pingoud A., Haupt W., Urbanke C., Mayer H., Maass G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 22, p. 6115—6127.
11. Сизова И. А., Глубин Е. Н., Гинзбург О. Ф., Терешин И. М. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 470—477.
12. Kolesnikov V. A., Zinoviev V. V., Yashina L. N., Karginov V. A., Baclanov M. M., Malygin E. G. FEBS Lett., 1981, v. 132, № 1, p. 101—104.
13. Воробьев М. А., Черняева А. Т., Кузмичева Т. П. В кн.: Материалы по обмену передового опыта и научных достижений в хим.-фарм. промышленности. М., 1958, № 1, с. 97—104.
14. Malygin E. G., Vannier P., Jot P. Gene, 1980, v. 8, № 1, p. 163—177.

Поступила в редакцию

14.VI.1985

После доработки

10.I.1986

#### DNA SEQUENCES PREFERABLE FOR BINDING DISTAMYCIN A AND ACRIDINE DERIVATIVES

YASHINA L. N., PONOMAREVA T. A., RECHKUNOVA N. I.,  
ZINOVIEV V. V., MALYGIN E. G., SHIBNEV V. A.\*

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,  
Novosibirsk Region;

\*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow

The specificity of DNA·dye binding was studied. Antibiotic distamycin A was bound most strongly to the DNA sequences composed of three or more neighboring A·T pairs. Acrichin and 7-aminoacrichin proved to be weak specific inhibitors binding predominantly within the A·T regions.