

5. Löber G., Koudelka J., Smekal E. Stacking interactions of ethidium bromide bound to a polyphosphate and phage DNA *in situ* // *Biophys. Chem.*—1974.—2, N 1.—P. 158—163.
6. Interaction of phenosafranin with nucleic acids and model polyphosphates / Z. Balkarova, V. Kleinwachter, J. Koudelka et al. // *Ibid.*—1978.—8, N 1.—P. 17—25.
7. Löber G. The fluorescence of dye-nucleic acid complexes // *J. Luminescence.*—1981.—22, N 2.—P. 221—265.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
9. Fluorescence analysis of G—C versus A—T binding of quinacrine to DNA / G. Baldini, S. Doglia, G. Sassi, G. Lucchini // *Int. J. Biol. Macromol.*—1981.—3, N 8.—P. 248—252.
10. Schwarz G. Cooperative binding to linear biopolymers // *Eur. J. Biochem.*—1970.—12, N 3.—P. 442—453.
11. Нечипуренко Ю. Д. Кооперативные эффекты при связывании протяженных лигандов с ДНК. II. Контактные взаимодействия между адсорбированными лигандами // *Молекуляр. биология.*—1984.—18, № 4.—С. 1066—1080.

Физ.-техн. ин-т низких температур АН Украины,  
Харьков

Получено 03.07.91

УДК 577.112

**В. И. Древаль**

## **ВЛИЯНИЕ АТФ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН**

*Исследовали влияние АТФ и ионизирующего излучения на структуру плазматических мембран тимоцитов с помощью определения анизотропии флюоресценции и тушения флюоресценции остатков триптофана мембранных белков. Данные анизотропии флюоресценции триптофана позволили установить наличие двух участков связывания АТФ на мембранных белках, определены константы связывания, число мест и энергия связывания. Показано изменение структуры белков плазматических мембран тимоцитов при воздействии ионизирующего излучения.*

В проводимых ранее исследованиях было установлено влияние ионизирующего излучения на структуру биологических мембран [1, 2]. Однако в литературе отсутствуют данные о динамике конформационных перестроек мембранных белков при воздействии радиации. В настоящее время для исследования динамических аспектов структурных перестроек белков широко используется флюоресцентная спектроскопия [3, 4]. Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния ионизирующего излучения на структуру мембранных белков плазматических мембран тимоцитов методом тушения триптофановой флюоресценции белков с применением АТФ.

**Материалы и методы.** В работе использовали плазматические мембраны тимуса крупного рогатого скота [5].

Флюоресценцию измеряли на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) при 25 °С в термостатируемых кюветах 10 × 10 мм. Среда инкубации содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,6, 10 мМ ЭДТА и 0,4 мг белка/мл. Гидролиз АТФ в эксперименте не наблюдался. Флюоресценцию остатков триптофана мембранных белков ( $\lambda_{\text{возб}}=280$  нм,  $\lambda_{\text{фл}}=340$  нм) определяли по методу [6].

Суспензию плазматических мембран тимоцитов облучали на импульсном линейном ускорителе электронов энергией 5 МэВ в дозах 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> и 10<sup>4</sup> Гр.

**Результаты и обсуждение.** Для исследования структурной динамики белков в качестве тушителя собственной флюоресценции белков использовали АТФ. Поэтому на первоначальном этапе работы было проведено изучение характера взаимодействия АТФ с мембранными

белками. В настоящее время для регистрации конформационных изменений и структурной динамики белков применяют флуоресценцию триптофановых остатков в белках [7, 8], теоретические основы этого метода изложены в работах [4, 9, 10]. Исходя из этого в наших исследованиях при оценке связывания АТФ с белками плазматических мембран мы регистрировали изменение анизотропии флуоресценции триптофановых остатков. Из рис. 1 видно, что по мере титрования мембран АТФ на кривой зависимости анизотропии триптофановой флуоресценции белков от концентрации АТФ отчетливо наблюдаются две ступени в пределах концентраций АТФ до 0,65 и 0,65—1,29 мМ. Если анизотропию флуоресценции использовать как

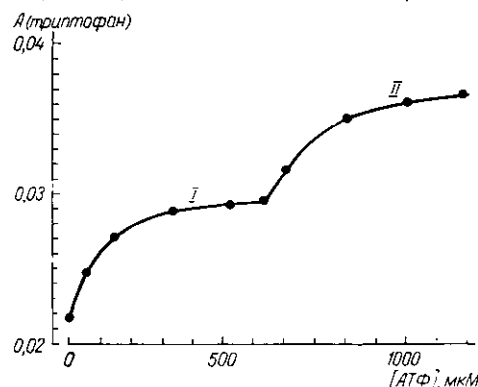


Рис. 1. Влияние АТФ на анизотропию триптофановой флуоресценции мембранных белков

допустить, что связывание молекулы АТФ с участком связывания на мембранном белке протекает как бимолекулярная реакция  $L + B \rightleftharpoons LB$  и вызывает изменение анизотропии флуоресценции остатков триптофана, пропорциональное числу занятых участков, то при флуориметрическом титровании мембран с определенной концентрацией белка переменными концентрациями АТФ степень насыщения участков каждого типа приобретает значения от 0 до 1. Это может быть рассчитано как отношение величины изменения анизотропии  $\Delta A$  (при данной концентрации АТФ) к величине  $\Delta A_{\text{max}}$  (при насыщении центров сорбции лигандом):

$$\bar{y} = \Delta A / \Delta A_{\text{max}} = [LB] / [B_0], \quad (1)$$

где:  $[LB]$  — концентрация участков, занятых АТФ;  $[B_0]$  — полная концентрация участков связывания, т. е.  $N$ . Получаем:

$$\bar{y} + \bar{y}K_a[L] = K_a[L], \quad (2)$$

где:  $K_a$  — константа связывания АТФ с центром сорбции;  $[L]$  — концентрация свободного АТФ;  $[L_0]$  — общая концентрация АТФ. То есть:

$$\bar{y} = \frac{K_a[L]}{1 + K_a[L]} = \frac{K_a([L_0] - [LB])}{1 + K_a([L_0] - [LB])}, \quad (3)$$

но так как

$$[LB] = \bar{y}[B_0], \quad (4)$$

то после преобразований:

$$1/1 - \bar{y} = K_a[L_0]/\bar{y} - K_a[B_0]. \quad (5)$$

Тогда тангенс угла наклона графика зависимости  $1/1 - \bar{y}$  от  $[L_0]/\bar{y}$  равен  $K_a$ , а отрезок, отсекаемый графиком на оси абсцисс, дает число участков связывания  $N$  [11]. Изложенный подход был использован для расчета связывания АТФ с плазматическими мембранами (табл. 1). Можно видеть, что количественно преобладают центры связывания II. В связи с этим возникает вопрос о природе этих центров связывания. Так как в простых равновесных условиях константа Михаэлиса является константой равновесия реакции диссоциации (т. е.  $K_a^{-1}$ ) [12], то

данные о свойствах  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран тимоцитов свидетельствуют о том, что  $K_a$  для субстрата Mg-АТФ находится в пределах  $(0,25-2,13) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  [13]. Это сопоставимо с константой ассоциации для центров связывания второго типа.

Исследовав связывание АТФ с белками плазматических мембран тимоцитов, мы изучили структурные изменения белков при воздействии

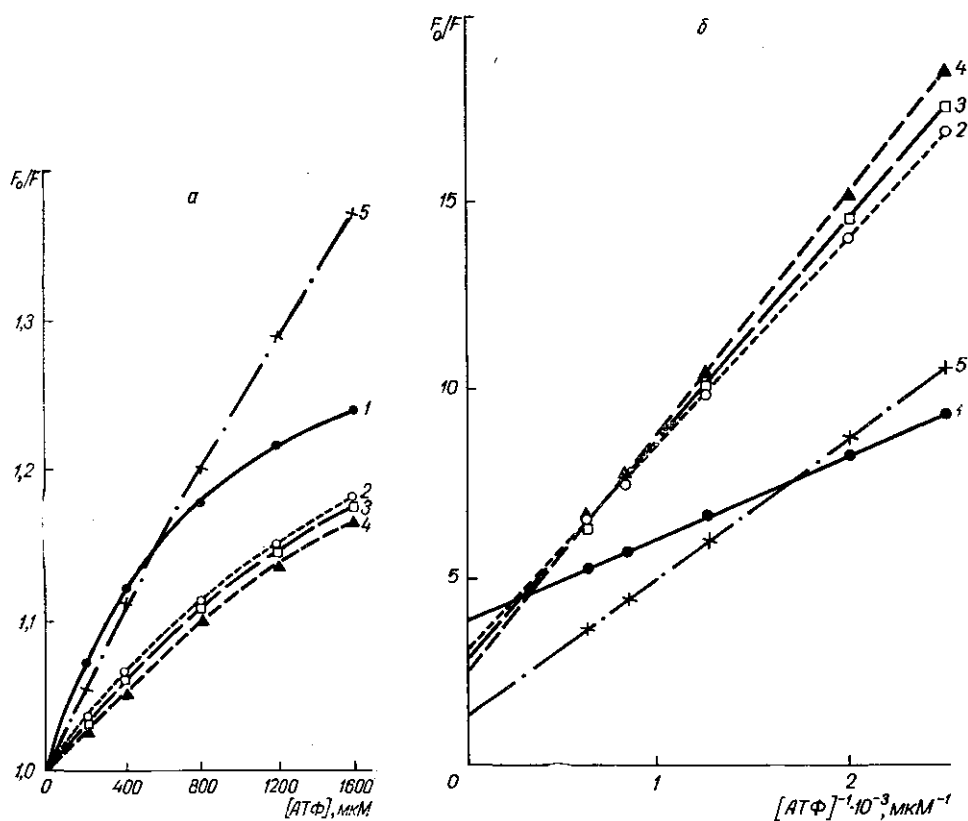


Рис. 2. Графики Штерна — Фольмера (а) и модифицированного уравнения Штерна — Фольмера (б) для тушения триптофановой флюоресценции плазматических мембран тимоцитов АТФ в контроле (1) и при облучении в дозах (Гр) 10 (2),  $10^2$  (3),  $10^3$  (4) и  $10^4$  (5)

ионизирующего излучения. При этом использовали тушение триптофановой флюоресценции белков молекулами АТФ. Можно видеть, что тушение флюоресценции остатков триптофана АТФ характеризуется изгибом графиков Штерна — Фольмера к оси абсцисс. Это позволяет заключить, что тушение флюоресценции остатков триптофана, обусловленное связыванием молекул АТФ с определенными мембранными бел-

Таблица 1  
Параметры связывания АТФ с плазматическими мембранами тимоцитов

Тип участка связывания	N, мкмоль/г белка	$K_a, \text{M}^{-1}$	$\Delta G_a^0$ , кДж/моль
I	30,0	$0,76 \cdot 10^6$	-33,6
II	2575,0	$1,02 \cdot 10^3$	-17,2

Примечание. N — число участков связывания;  $K_a$  — константа связывания АТФ;  $\Delta G_a^0$  — изменение свободной энергии взаимодействия АТФ с мембраной.

Таблица 2  
Характеристика тушения флюоресценции белков плазматических мембран тимоцитов АТФ

Параметр	Доза облучения, Гр				
	0	10	$10^2$	$10^3$	$10^4$
$K_{SV}, 10^{-5} \text{ мкМ}^{-1}$	11,86	5,88	5,89	6,15	20,91
$f_1$	0,26	0,32	0,36	0,37	0,77

ками, может быть применено для определения той части общей интенсивности флюоресценции, которая связана с поверхностно локализованными остатками. Поэтому тушение флюоресценции анализировали, используя модифицированную форму уравнения Штерна — Фольмера [3]:

$$F_0/\Delta F = 1/f_1 \cdot K_{SV} \cdot [Q] + 1/f_1, \quad (6)$$

где:  $F_0$  — общая флюоресценция в отсутствие тушителя;  $F$  — интенсивность флюоресценции в присутствии тушителя;  $\Delta F = F_0 - F$ ;  $K_{SV}$  — константа Штерна — Фольмера;  $[Q]$  — концентрация тушителя (АТФ);  $f_1$  — доля флюоресценции, доступная для тушения. На графике зависимости  $F_0/\Delta F$  от  $1/[Q]$  (рис. 2, б) значение  $f_1$  определяли по отсекаемому на оси ординат отрезку, а  $(f_1 K_{SV})^{-1}$  — по наклону. В табл. 2 приведены величины  $f_1$  и  $K_{SV}$  для тушения флюоресценции остатков триптофана белков плазматических мембран в зависимости от дозы облучения. Результаты позволяют заключить, что облучение мембраны в дозах до  $10^3$  Гр приводит к возрастанию структурной жесткости мембранных белков. Вместе с тем дальнейшее повышение дозы до  $10^4$  Гр приводит к увеличению  $K_{SV}$  в среднем в 3,5 раза, что указывает на существенное снижение структурной жесткости белков. Тот факт, что величина  $f_1$  возрастает при увеличении дозы излучения, позволяет сделать вывод о том, что участки полипептидных цепей, погруженных в липидный бислой, становятся более доступными для АТФ. Очевидно, наблюдаемые изменения доступности остатков триптофана молекулам АТФ при воздействии ионизирующей радиации являются следствием изменения динамического состояния белковой глобулы, возможно, за счет изменения белок-липидных взаимодействий.

**Резюме.** Досліджено вплив АТФ та іонізуючого випромінювання на структуру плазматичних мембран тимоцитів за допомогою визначення анізотропії флюоресценції і гасіння флюоресценції залишків триптофану мембранных білків. Результати анізотропії флюоресценції триптофану дозволили встановити наявність двох ділянок зв'язування АТФ на мембранных білках, знайдено константи зв'язування, число місць та енергію зв'язування. Показано зміну структури білків плазматичних мембран тимоцитів при дії іонізуючого випромінювання.

**Summary.** The effect of ATP and ionizing radiation on the structure thymocytes plasma membranes was studied. Using fluorescence quenching technique two plats for ATP binding on membrane proteins were located. The influence of ionizing radiation on plasma membranes thymocytes was shown.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сунгуров А. Ю. Радиационная биология клеточной поверхности.— М.: ВИНТИ, 1988.— 178 с.— (Сер. Радиц. биология; Т. 7).
2. Подивода Б. Н., Конев В. В., Попов Г. А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.— М.: Энергоатомиздат, 1990.— 160 с.
3. Лакочич Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
4. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 60 с.
5. Древиць В. И., Назаренко Н. Д. Связывание ионов кальция с плазматическими мембранами тимоцитов // Биол. науки.— 1991.— № 1.— С. 27—31.
6. Fomenko B. S., Dougii L. E., Akoev L. G. The effect of ionizing radiation on tryptophan fluorescence of thymocyte and erythrocyte plasma membranes // Int. J. Radiat. Biol.— 1983.— 44, N 3.— P. 307—311.
7. Исследование равновесной динамики структуры белков клетки методом триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре / В. М. Мажуль, С. В. Конев, Ю. С. Ермолаев и др. // Биофизика.— 1983.— 28, № 6.— С. 980—983.
8. Мажуль В. М., Ермолаев Ю. С., Конев С. В. Триптофановая фосфоресценция при комнатной температуре — новый метод изучения структурного состояния биологических мембран и белков в клетке // Журн. прикл. спектроскопии.— 1980.— 32, № 5.— С. 903—907.

9. Semisotnov G. V., Zikherman K., Kasatkina S. B. Polarized luminescence and mobility of tryptophan residues in polypeptide chains // Biopolymers.— 1981.— 20, N 8.— P. 2287—2309.
10. Бурштейн Э. А. Собственная люминесценция белка. Природа и применение.— М.: ВНИИТИ, 1977.— 190 с.— (Сер. Биофизика; Т. 7).
11. Эдсолл Дж., Гатфренд Х. Биотермодинамика.— М.: Мир, 1986.— 195 с.
12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.— 889 с.
13. Древалъ В. И., Финашин А. В. Влияние периферических белков на активность  $Ca^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран // Укр. биохим. журн.— 1990.— 62, № 4.— С. 87—89.

Харьков. гос. ун-т

Получено 15.03.91

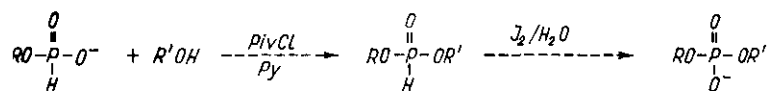
УДК 577.113.6

И. Я. Дубей, Т. В. Ляпина, Д. М. Федоряк

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ В СИНТЕЗЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ

*Изучены основные побочные реакции, сопутствующие межнуклеотидной конденсации в Н-фосфонатном методе олигонуклеотидного синтеза, и исследована их кинетика в присутствии ряда оснований. Найдены устойчивые модификации гетероциклических оснований пивалоилхлоридом. Показано, что ацилирование Р—Н-связей приводит к расцеплению олигонуклеотидной цепи в местах, содержащих Р—С-связи. Обнаружено, что скорость побочных реакций в несколько раз ниже в хиолине, чем в более основном пиридине.*

**Введение.** Последние достижения генетической инженерии и биотехнологии сопровождались и в значительной степени были обусловлены прогрессом в области химического синтеза фрагментов ДНК. Доступность олигонуклеотидов заданной последовательности революционизировала биологические исследования на молекулярном уровне. Синтетические олигонуклеотиды используются в химико-ферментативном синтезе генов, при секвенировании ДНК, для направленного мутагенеза, как гибридизационные зонды при выделении и клонировании генов и т. д. [1, 2]. Таким образом, спектр применения синтетических фрагментов ДНК весьма широк и потребность в них постоянно возрастает. В последнее время все большее распространение получает Н-фосфонатный метод олигонуклеотидного синтеза [3, 4], отличающийся простотой, высокой скоростью и эффективностью (схема 1). Однако существенным



$RR'$  — остатки нуклеозидов;  $\text{Piv} = \text{Me}_3\text{C}-\text{CO}-$ ;  $\text{Py}$  — пиридин

недостатком метода является протекание побочных реакций, вызываемых используемым для активации нуклеотидного компонента конденсирующим реагентом, что ведет к значительному снижению эффективности синтеза. Этому вопросу был посвящен ряд работ [5, 6], в которых описаны основные типы побочных реакций, сопутствующих Н-фосфонатной межнуклеотидной конденсации. В настоящей работе продолжено изучение побочных процессов в присутствии пивалоилхлорида (PivCl) — основного конденсирующего реагента, применяемого в Н-фосфонатном методе синтеза олигонуклеотидов.

**Материалы и методы.** В работе использованы метилимдазол (MeIm), диметиламинопиридин (DMAP), PivCl, 2, 6-лутидин («Fluka», Швейцария),  $\gamma$ -пиколин, 2, 4, 6-коллидин, ацетонитрил для ВЭЖХ

© И. Я. ДУБЕЙ, Т. В. ЛЯПИНА, Д. М. ФЕДОРИЯК, 1992