

## 송아지 胸腺 DNA 의 Spermine에 依하여 誘發되는 異例的 吸光度- 溫度 樣相에 미치는 Ethidium Bromide의 影響

李璨容 · 高東成†

忠南大學校 理科大學 化學科

(1984. 6. 8 접수)

## Effect of Ethidium Bromide on Anomalous Absorbance-Temperature Profile, of Calf Thymus DNA, Induced by Spermine

Chan Yong Lee and Thong-Sung Ko

Department of Chemistry, College of Sciences, Chungnam National  
University, Dae Jeon 300-31, Korea

(Received June 8, 1984)

要 約. 송아지 胸腺 DNA 가 單分子的 凝縮된 (collapsed) 構造를 이루는 spermine 濃度에서 얻어지는 異例的 吸光度-溫度 樣相<sup>6</sup> (anomalous absorbance-temperature profile)의 trough 領域에 이르는 相變移에 對한 cooperativity, enthalpy, 및 相變移 midpoint를 求하여 그 값들을 Tm 領域의 값들과 比較한 結果 그 두 그룹의 값들은 서로 相異하였으며 前者的 값들이 後者の 값들 보다 ethidium bromide에 對하여 더 銳敏하였다. Ethidium bromide 濃度를 增加시킴에 따라서 그 trough의 깊이가 작아져서 終局의 으로 없어졌으나 그와 對照的으로 Tm 은 實質的으로 一定하게 維持되었다. 本 研究結果를 基礎로 하여 DNA 凝縮 메카니즘을 推理하였다.

**ABSTRACT.** An anomalous absorbance-temperature profile of calf thymus DNA, having a trough preceding the initiation of the melting, occurs at the spermine concentration, where the DNA collapses into a compact structure. The cooperativity, enthalpy, and the midpoint of the phase transition to the trough region are more sensitive to ethidium bromide than those of the Tm region. As the concentration of ethidium bromide added is increased, the peak size of the trough is decreased, while the Tm remains essentially constant.

### 序 論

Planar aromatic chromophore group 을 所有하고 있는 intercalating drugs 는 細胞成長妨害, 細胞死滅, 細胞變換 等 廣範圍한 生物學的 効果를 가진다는 것이 많이 報告되고 있으며<sup>1,2</sup> 特히 이를 效果는 빨리 增殖되는 細胞에 對하여 顯著하게 나타나므로 많은 intercalating drugs 가 anti-bacterial, antiparasitic 및 antitumor agents 로 쓰인다. 分子的 水準에서 intercalating agents 는 DNA 에 結合하므로써 DNA 依存性 酵素들의

妨害, frameshift mutagenesis 및 DNA 的 損傷等의 作用에 의하여 chromatin structure의 變化, plasmids 및 mitochondrial DNA 等의 短은 circular DNAs의 選擇的 消失 等을 일으킨다고 理解되고 있다.<sup>3</sup> 한편 큰 陰荷電 密度를 갖는 線型의 DNA 는 生命體 内에서 大部分 polyamines, histones, 및 金屬陽이온 物質들에 의하여 靜電氣的 反撥이 中和되므로써 compact form 으로 凝縮되어 安定化된 構造로 chromosomes 및 viral capsid 等에 存在한다.

따라서 intercalating agents 와 DNA 的 相互作

用에 미치는 polyamines의 影響에 對한 研究는 여러가지 側面에서 重要함을 알 수 있다. 이하 한 研究에 있어서 化學分光學的 方法은 特히 有効하고 重要한데 그 理由는 intercalating agent의 planar aromatic chromophore에 基因하는 分光學的 特性的 變化 뿐만 아니라, DNA 自體의 分光學的 特性的 變化를 intercalating agent와 DNA 와의 相互作用 機構 및 그에 따른 DNA의 3次元的 構造變移에 對한 spectroscopic probe 들로서 便利하고 有効하게 쓸 수 있기 때문이다.

本 論文에서는 calf thymus DNA의 compact form으로의 collapse를 誘發시키는 spermine濃度下에서 그 DNA의 異例的 吸光度-溫度樣相이 일어남을 觀察하였다. 따라서 그 異例的 樣相의 相變移(phase transition)에 대한 transition enthalpy, cooperativity, midpoint 등에 미치는 ethidium bromide의 影響을 調查하였다. 그 data를 基礎로 하여 spermine에 依한 DNA의 單分子的 凝縮 및 그에 미치는 ethidium bromide의 作用 機構를 考察하였다.

#### 實驗方法 및 材料

송아지 胸腺 (calf thymus) DNA(Type I)는 美國 Sigma chemical Company로 부터 購入한 것을 그대로 使用하였으며 그 溶液은 0.008M citrate buffer, pH 7.0에 녹여 만들었다. DNA의 濃度는  $\epsilon_{260}=6600 M^{-1}$  DNA phosphate를 使用함으로써 A<sub>260</sub>으로 부터 決定하였다<sup>4</sup>. 熱變性 DNA는 前에 이미 報告된 方法에<sup>5</sup> 따라 製造하였다.

DNA 溶液에 spermine을 加할 경우에는 citrate buffer에 稀釋된 溶液을 DNA 溶液이 담겨진 試驗管의 器壁을 따라서 서서히 加하면서, 그 DNA 溶液을 잘 저어 주었다. 모든 分光學的 試驗은 Pye Unicam SP 1800 分光光度計를 써서 最終 組成이 0.008M citrate, pH 7.0인 緩衝溶液에서 遂行되었다.

Ethidium-DNA 結合에 對한 分光學的 滴定, spermine-DNA 結合에 對한 平衡透析, native 및 denatured DNA의 溫度-吸光度 樣相에 對한 spermine 및 ethidium bromide의 영향에 대한 實

驗은 前에 著者들이 이미 報告한<sup>6</sup> 實驗條件를 下에서 實施하였다.

#### 結果 및 考察

最近에 Wilson과 Bloomfield等은<sup>7</sup> spermine 및 spermidine과 같은 polyamine類에 依한 DNA分子의 單分子的 凝縮된 構造로의 무너짐(collapse)를 誘發하는 條件들을 探求한 data에 Manning's counter ion condensation theory<sup>8</sup>를 滴用 시키므로써 DNA backbone의 陰荷電의 89~90%가 中和되면 DNA의 單分子的 凝縮된 構造로의 collapse가 일어남을 報告하였다.

著者들이 前에 遂行한 研究에서<sup>6</sup>, DNA가 凝縮되는 spermine濃度( $3 \times 10^{-4} M$ )存在下 260nm에서의 absorbance-temperature profile은 DNA의 melting이始作되기 前에 下方向으로 吸光度減少에 基因하는 trough를 갖는다는 것이 알려졌다. 한편 DNA backbone phosphate의 큰 陰荷電 密度에 依한 靜電氣的 反撥에 基因하는 單分子的 凝縮構造에의 障碍壁이 spermine과 같은 陽이온 (+4)에 依하여 充分히 낮추어질 경우 hydrophobic interaction에 의하여 自發的으로 凝縮이 일어날 수 있을 것이다. 이러한 過程은 溫度上昇에 依하여 有利하므로 그 單分子的 凝縮이 安定化 될 것이라고 생각되며, melting이 일어나기 직전 下方向으로 trough를 갖는 spermine-DNA complex 260 nm에서의 그 異例的 吸光度-溫度 樣相은 溫度上昇에 의한 DNA의 單分子的 凝縮構造의 安定化에 基因할 것이라고 推理되므로 本研究에서는 이에 對한 確認實驗을 위하여 몇 가지 相異한 spermine濃度에서의 吸光度-溫度 樣相의 特性을 調査하였다. 그 結果 Fig. 1에서 보는 바와 같은 anomalous melting profiles가 얻어졌다. 이 그림에서 spermine濃度가 增加함에 따라 Tm이 높아져서 그 melting profile이 오른쪽으로 移動되며 Tm에서의 phase transition cooperativity가 變化되는 것에 追加하여 melting이始作되기 前에 溫度上昇에 따른 吸光度減少에 基因하여 생기는 downward peak(trough)는 spermine濃度增加에 따라서 점차적으로 그 크기(hypochromicity)가 增加함을 볼 수 있다. 그러나 著者들이<sup>6</sup> 前에 遂行한 實驗과

같은 條件에서 denatured DNA 的 경우는 native DNA 와 달리 이러한 anomalous profile 을 갖지 않음을 Fig. 2에서 볼 수 있다. 우리는 前에 適行한 viscometric titration 실험에 의하여 native DNA 는 spermine 浓度  $3 \times 10^{-4} M$ 에서 가장 compact 한 構造를 갖지만 變性 DNA 는 이와 대조적으로 分子間 aggregate 를 形成함을 推理할 수 있었다.<sup>9</sup> 따라서 이들 前에 얻어진 data 를 參酌할 경우  $3 \times 10^{-4} M$  spermine 存在下 DNA 溶液의 溫度 增加에 따라서 그 吸光度 減少 깊이

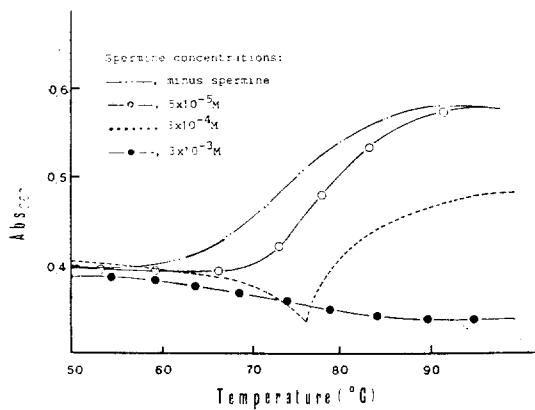


Fig. 1. Effect of spermine on the absorbance-temperature profiles of DNA.

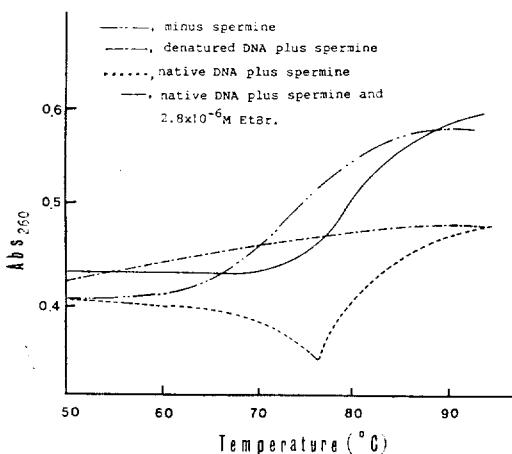


Fig. 2. Anomalous absorbance-temperature profile of DNA. The concentration of spermine added is  $3 \times 10^{-4} M$ .

(hypochromicity)가 最大로 되는 trough 는 溫度 增加에 따라 그 安定度가 增加되는 hydrophobic interaction에 依한 DNA 3次元的 構造 즉 單分子的 凝縮된 構造에 基因하는 것으로 推理된다. DNA 的 두 隣接 base pairs 사이에 intercalate 되는 Planar chromophore 는 그 base pairs 사이의 間隔을 增加시킴으로써 DNA 的 全體的 길이를 더 길게 만들어 주는 結果를 가져 오며<sup>10~12</sup> closed circular DNA-duplex 的 풀림 (unwinding) 効果를 가져옴이 알려져 있다.<sup>13~15</sup> 이와 같은 intercalating agents 的 DNA에 對한 効果는 DNA 的 構造를 콤팩트한 構造로 무너지게 하는 (collapse시키는) polyamines 的 効果와 對照의이라고 볼 수 있으므로 spermine에 依한 calf thymus DNA 的 單分子的 凝縮效果는 ethidium bromide에 依하여妨害的 영향을 받으리라고豫測된다. 異例的 吸光度-溫度 樣相이 과연 溫度上昇에 따른 單分子的 凝縮된 構造의 安定化에 基因한다면 이 異例的 吸光度-溫度 樣相도 ethidium bromide에 依하여 영향 받으리라고豫測된다. 따라서 本研究에서는 특히 anomalous absorbance-temperature profile 的 trough 形成에 對한 phase transition에 미치는 ethidium bromide 的 影響을 調査하였다. 그에 對한 data 를 Fig. 3에서 보여 준다. 加하여 주는 ethidium bromide 的濃度가 增加함에 따라서 trough 的 깊이가 점점 낮아지고, 폭이 넓어진다. 또한 trough 가 左側으로 移動되어 trough 形成에 對한 phase transition midpoint ( $T_c$ )가 점점 낮아진다. 결국 ethidium bromide 的濃度가  $2.8 \times 10^{-6} M$ 에 이르면 그 trough 가 거의 消失됨을 볼 수 있다. 이 trough 형성에 대한 phase transition 的 特性을 좀 더 正確하게 分析하기 위하여 이 phase transition에 對한 two-state transition 모델을 假定하고 그 spermine 浓度 ( $3 \times 10^{-4} M$ )에서 ethidium bromide 浓度 增加에 따른 trough peak에 이르는 phase transition 과  $T_m$  region의 phase transition에 對한 transition enthalpy ( $\Delta H$ )를 각각 求하여 Table 1에 실었다. 이 表에서 ethidium bromide 的濃度가 增加함에 따라  $\Delta H$ 가 그 두 경우 共히 增加하지만 trough에 對한  $\Delta H$ 의 增

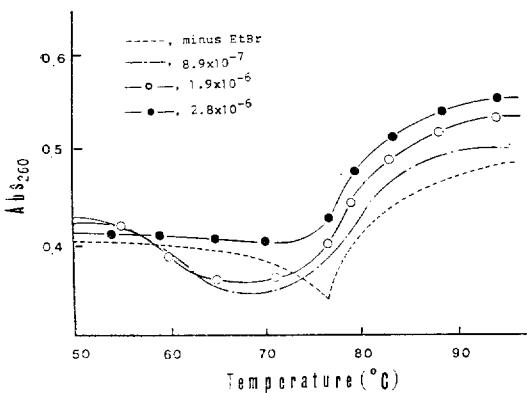


Fig. 3. Effect of EtBr on the anomalous absorbance-temperature profile of DNA in the presence of  $3.0 \times 10^{-4} M$  spermine.

加倍이 더 큼을 알 수 있다. Spermine 存在下 생기는 이 trough가 ethidium bromide를 加하여 줌으로써 없어지는 것은 加하여지는 ethidium bromide에 의하여 spermine이 DNA로부터 유리 되기 때문이 아님은 著者들이<sup>16</sup> 前에 遂行한 DNA의 ethidium에 의한 分光學的 滴定 data에 對한 empirical Hill plot로부터 알 수 있다. Spermine 不在時 및 存在時 ( $3 \times 10^{-4} M$ ) 兩경우 共히 ethidium bromide의 DNA와의 結合에 對한 Hill plot은 biphasic 하며 ethidium bromide 농도의 높은 영역의 phase는 ethidium bromide 濃度가 낮은 영역의 phase 보다 더 큰 Hill coefficient를 가진다. 또한 그 Hill plot에 의하면 ethidium bromide는 spermine이 存在하지 않을 경우 negative cooperative binding을 하지만 spermine이 存在할 경우에는 positive cooperative binding을 할 수 있을 뿐만 아니라 spermine이 存在할 경우 ethidium의 DNA와의 affinity가 감소됨을 알 수 있었다.<sup>6</sup> 따라서 spermine이 존재할 경우와 존재하지 않는 경우 ethidium bromide의 DNA와의 結合 특성이 달라짐을 알 수 있다. 그러므로 本研究에서 觀察되는 ethidium bromide의 anomalous absorbance-temperature profile에 미치는 效果는 ethidium bromide에 의한 spermine의 結合된 DNA로 부터의 단순한 유리에 기인한다고 할 수 없을 것이다. 즉 spermine이 존재할 경우前述한바와

같이 DNA duplex lengthening 및 unwinding의 結果를 가져오는 intercalative binding (negative cooperative binding)이며 strong binding이 抑制되고 반면에 ethidium의 dye-dye stacking에 의하여 安定化되는 aggregated ethidium의 連續的 tracts가 DNA helix 外部에 靜電氣的相互作用에 의하여 結合을 이루는 etihdium bromide의 positive cooperative binding(weak binding)이亢進된다고 推理된다. 이러한 後者の ethidium bromide-DNA 相互作用 方式, 즉 ethidium bromide의 DNA와의 positive cooperative binding方式이 DNA의 spermine 결합에 의한 kinky helix의 形成을 妨害하므로써 spermine-DNA 복합체의 單分子的 凝縮構造를 不安定化시킬 경우 ethidium bromide는 本研究結果에서 보는바와 같이 spermine에 의하여 생기는 DNA의 anomalous absorbance-temperature profile의 형성을 妨害하는 效果를 가져오리라고 推理된다. ethidium bromide가 phase transition midpoint에 미치는 영향을 보여주는 Fig. 4에서 trough 형성 phase transition midpoint( $T_c$ )는 ethidium bromide濃度變化에 따라 상당한 減少를 보여주는 것과 對照的으로  $T_m$ 은 感知할만한 變化가 없음을 보여준다. ethidium bromide濃度增加에 따라  $T_m$ 이 높아져야 함에도 不拘하고 感知할만한

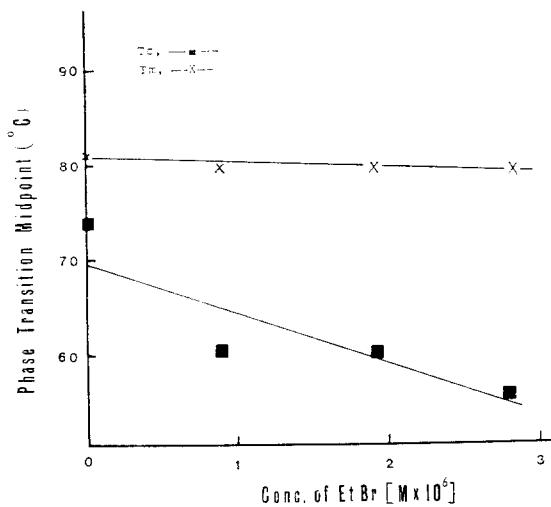


Fig. 4. Effect of ethidium bromide on phase transition midpoints.

變化가 없음은 單分子的 濃縮構造를 갖는 spermine-DNA complex에 있어서 ethidium bromide는 intercalative binding을 하지 않음을暗示한다고 볼 수 있으며, 따라서 위에서 본 ethidium bromide가 DNA의 異例의 吸光度-溫度 樣相의 형성을 방해하는 메카니즘에 대한 우리의 推理를 더욱 지지하여 주는 data라고 볼 수 있을 것이다.  $T_m$ 과는 對照的으로  $T_c$ 가 ethidium bromide濃度增加에 따라서 낮아지는 理由는 ethidium bromide濃度增加에 따른 trough 형성 phase transition 즉 hydrophobic interaction에 의한 tertiary structure 형성 相變移 cooperativity가 낮아지므로써 相變移의 폭이 커지고 왼쪽으로 trough shift가 일어나기 때문이라고 推理된다(Fig. 5 참조).

Fig. 5는 trough peak에 이르는 相變移 및  $T_m$  영역 相變移에 대한 relative cooperative length( $n$ )의 ethidium bromide 依存性을 보여준다. ethidium bromide濃度增加에 따라 trough 형성 相變移에 對한  $n$ 는 比較的 빠른 속도로 減少함에 不拘하고  $T_m$  영역 相變移에 對한  $n$ 는 그와 反對로 서서히 增加함을 볼 수 있다. Phase transition midpoints ( $T_m$  및  $T_c$ )의 ethidium

bromide濃度依存性을 보여주는 Fig. 4에 있어 서도 앞에서 본바와 같이 ethidium bromide濃度增加에 따라서 trough 형성 相變移의 midpoint ( $T_c$ )는 減少됨에 不拘하고 그와 對照的으로  $T_m$ 은 거의一定함을 볼 수 있다.  $T_m$  영역 相變移와 trough 형성 相變移 transition enthalpy ( $\Delta H$ )에 미치는 ethidium bromide의 영향을 보여주는 Table 1에 있어서도 ethidium bromide濃度增加에 따른 trough 형성 相變移 transition enthalpy 變化率은  $T_m$  영역 相變移 transition enthalpy 變化率 보다 월등 커서 4배 이상되며 그 transition enthalpy 부호가 서로 反對임을 알 수 있다. 따라서 우리는 이를 그림 및 표의 data를 基礎로 하여 spermine存在時 얻어지는 異例의 吸光度-溫度 樣相이 갖는 두部分의 profiles 즉 trough 영역 profile과  $T_m$  영역 profile은 相異한 種類의 3次元的 構造變移에 基因하며 trough部分 profile에 該當되는 3次元的 構造變移는  $T_m$  영역 부분 profile에 該當되는 3次元的 構造變移보다 ethidium bromide에 對하여 더 銳敏함을 推理할 수 있다.

$T_m$  영역 profile에 該當되는 相變移에 있어서는 實질적으로 水素結合을 이루고 있는 두 strands의 分離, 즉 secondary 構造가 관여된다고 볼 수 있으므로  $T_c$  영역 profile에 該當되는 相變移는 그와 다른 3次元的 構造 즉 주로 hydrophobic interaction에 의하여 이루어지는 tertiary 構造가 관여된다고 推理할 수 있을 것이다. 또한 이 hydrophobic interaction에 의하여 이루어지는 tertiary structure는 spermine에 의하여 DNA의

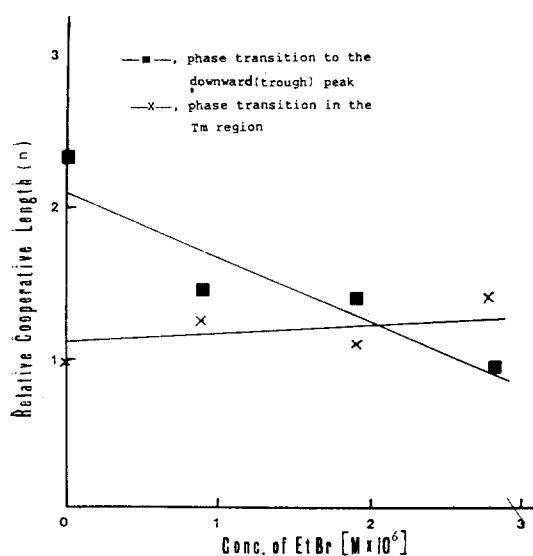


Fig. 5. Effect of ethidium bromide on the relative cooperative length( $n$ ).

Table 1. Effect of Ethidium Bromide on the enthalpy of the phase transition of the  $T_m$  region and on that of the phase transition to the trough of the anomalous melting profile of the DNA.

Conc. of EtBr (M)	$\Delta H$ (kcal/mol)	
	Though	$T_m$ region
0	-319.3	105.3
$8.9 \times 10^{-7}$	-175.5	135.1
$1.9 \times 10^{-6}$	-171.9	119.8
$2.8 \times 10^{-6}$	-125.5	142.7

陰荷電들이 充分히 中和될 경우 自發의으로 DNA의 單分子的 凝縮構造를 이루게 되는 構造變移라고 볼 수 있을 것이다. 또한 著者들이 前에遂行한 研究結果<sup>6</sup>에 依하면 spermine이 직접結合되지 않은 部位에도 allosteric 効果의 傳播에 依하여 삼차원적 構造變移가 일어나므로써 전체적인 單分子의 응축구조로의 脱離가 可能하리라고 생각된다.

結論的으로  $3 \times 10^{-4} M$  spermine의 存在時 單分子의 凝縮構造가 最大로 이루어진다는 研究 data<sup>9</sup>와 이 spermine濃度에서 最大 downward peak를 갖는 異例的 吸光度-溫度 樣相이 顯어지는 本研究 data를 綜合 考察할 경우 trough 部分 profile에 該當되는 相變移에 對한 構造變移到를 갖는 3次元的 structural species는 spermine에 依하여 誘發되는 單分子의 凝縮된 構造에 이르는 hydrophobic interaction에 의한 tertiary structure 형성일 것이라고 推理할 수 있으며 이와 같은 tertiary structure는 Tm領域 吸光度-溫度 樣相에 該當되는 相變移에 관여하는 secondary structure 보다 thermal structural transition에 있어서 ethidium bromide에 對하여 더 敏感함을 本研究에 의하여 推理할 수 있다.

本論文은 1984年度 文敎部 基礎科學特性化 分野 學術研究助成費에 依하여 研究되었음.

#### 引用文獻

- H. S. Schwartz, *Adv. Cancer Chemother.*, **1**, 1 (1977).
- S. Neidle, *Prog. Med. Chem.*, **16**, 151 (1979).
- P. M. Kanter, H. S. Schwartz, *Cancer Res.*, **39**, 3661 (1979).
- D. E. Graves, C. L. Watkins, and L. W. Yielding, *Biochemistry*, **20**, 1887 (1981).
- T-S Ko, J. Huh, C-B. Lee and M. K. Park, *J. Korean Chem. Soc.*, **27**, 429 (1983).
- T-S. Ko, J. Huh, and C.Y. Lee, *J. Korean Chem. Soc.*, **28**, 185 (1984).
- R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, *Biochemistry*, **18**, 2192 (1979).
- G. S. Manning, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179 (1978).
- T-S. Ko and J. Huh, *J. Korean Chem. Soc.*, **28**, 70 (1984).
- J. Cairns, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **22**, 311 (1962).
- G. Cohen and H. Eisenberg, *Biopolymers*, **8**, 45 (1969).
- M. E. Hogan, M. Dattagupta, and D. M. Crothers, *Biochemistry*, **18**, 280 (1979).
- W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4876 (1975).
- L.F. Liu and J.C. Wang, *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 405 (1975).
- J. C. Wang, *J. Mol. Biol.* **783** (1974).
- T-S. Ko et al., data presented at the 54th Annual Meeting, 1984, Korean Chemical Society.
- F. H. C. Crick and A. Klug, *Nature*, **255**, 530 (1975).