



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 577.150

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ *cis*-DDP НА АДСОРБЦИЮ ЛИГАНДОВ НА ДНК

В.Б. АРАКЕЛЯН, С.Г. АРУТЮНЯН, Г.С. САРКИСЯН,
П.О. ВАРДЕВАНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

В рамках стохастического описания адсорбции лигандов на ДНК показано, что при малых концентрациях *cis*-DDP, связываясь с ДНК, вызывает изменения как изотермы адсорбции лигандов, так и дисперсии числа связанных с ДНК лигандов. Линейная, в координатах Скэтчарда, изотерма адсорбции трансформируется в нелинейную изотерму, а на кривой зависимости дисперсии от концентрации лигандов изменяются как величина максимума, так и его положение.

ՊՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման ստոխաստիկ նկարագրության շրջանակներում ցույց է տրված, որ *cis*-DDP-ի փոքր կոնցենտրացիաները հագեցնում են ՊՆԹ-ի հետ լիգանդների ադսորբման կորերի, ինչպես նաև կապված մոլեկուլների դիսպերսիայի փոփոխությունների: Սկետչարդի կորորդինատներով կառուցված կապման ուղղագիծ կորը ձևափոխվում է ոչ գծային կորի, իսկ լիգանդի կոնցենտրացիայից դիսպերսիայի կախվածության կորի վրա փոխվում են և մաքսիմումի մեծությունը, և դիրքը:

Within the framework of stochastic description of ligands adsorption on DNA it is shown that at low concentrations *cis*-DDP, bound with DNA, causes changes in both isotherms of ligand adsorption and dispersions of number of ligands bound with DNA. The linear isotherm of adsorption, in Scatchard's coordinates, transforms to a nonlinear one. The value of maximum as well as its position on the curve of dispersion dependence on the ligand concentration are also changed.

ДНК - cis-DDP - лиганды - кривая Скетчарда – изотерма адсорбции

В настоящее время широко исследуется взаимодействие различных низкомолекулярных веществ-лигандов с ДНК, поскольку, связываясь с ДНК различными способами – нековалентным (интеркаляционным, внешним) и ковалентным, эти вещества могут по-разному менять конформацию макромолекулы и тем самым влиять на структуру ДНК [2, 4, 5 18]. Нековалентное связывание лигандов с ДНК является обратимым.

Это обстоятельство позволяет с помощью хорошо разработанного метода анализа изотерм адсорбции получать ценную информацию о взаимодействии большого класса обратимо связывающихся лигандов с ДНК. Однако целый ряд веществ, в том числе и противоопухолевый препарат *cis*-DDP, связываются с ДНК ковалентно, необратимым образом. Это исключает прямое применение метода анализа изотерм адсорбции для исследования процесса связывания таких лигандов с ДНК. Можно ожидать, что необратимое связывание некоторых лигандов с ДНК может привести к такому изменению структуры ДНК, которое будет влиять на адсорбцию обратимо связывающихся лигандов с ДНК. Эти исследования представляют ценность еще и потому, что в реальной клеточной системе ДНК окружена многочисленными различными соединениями и связывание только одного лиганда с ДНК скорее всего является исключением, чем правилом. Особый интерес представляет исследование взаимодействия противоопухолевого препарата *cis*-DDP с ДНК. Считается, что *cis*-DDP ингибирует синтез ДНК в быстро размножающихся раковых клетках, необратимо связываясь с ней [7, 14,17]. Связывание этого вещества с ДНК нарушает ее структуру таким образом, что репликация либо не происходит, либо она приводит к образованию нежизнеспособных клеток.

Целью данной работы является исследование влияния *cis*-DDP на адсорбцию лигандов с ДНК, поскольку исследование изотермы связывания в трехкомпонентной системе может дать дополнительную информацию о механизме необратимо связывающихся лигандов с ДНК.

Теоретическая часть. Рассмотрим адсорбцию лигандов в условиях, когда мало не только количество необратимо связывающегося вещества (*cis*-DDP) с ДНК, но и количество обратимо связывающегося лиганда, т.е. при малых заполнениях ДНК. Будем исходить из того факта, что при малых заполнениях ДНК *cis*-DDP в молекуле ДНК образуются псевдокольцевые структуры [1], поскольку *cis*-DDP образует мостики между гуанинами ДНК, удаленными друг от друга. Образование псевдокольцевых структур в ДНК приводит к тому, что в молекуле полимера образуются частично раскрученные участки. Это обстоятельство позволяет принять, что в ДНК можно различить две области с различными адсорбционными свойствами – области с кольцевыми структурами и области внекольцевых ДНК. Естественно считать, что эти области имеют различные константы связывания и различное число мест, с которыми может связаться одна молекула лиганда. Так как адсорбция на этих участках идет независимым образом, то адсорбцию лиганда на ДНК можно представить как результат совместной адсорбции на двух участках ДНК. Для вычисления изотермы адсорбции на такой ДНК вначале вычислим изотерму адсорбции на одном из участков ДНК, а затем по аналогии – для второго участка и просуммируем их.

Предположим, что число адсорбционных центров (число пар оснований) на ДНК равно N и с ДНК связалось m молекул *cis*-DDP. Для простоты примем, что каждая связанная молекула *cis*-DDP приводит к образованию кольца, в котором заключено l пар оснований. (Поскольку общее число связанных с ДНК *cis*-DDP мало, то число молекул *cis*-DDP

внекольцевых структур тоже мало и их влиянием на свойства ДНК можно пренебречь.) Таким образом, число пар оснований в кольцевой ДНК будет $N_2 = ml$. Число пар оснований внекольцевой ДНК будет $N_1 = N - N_2$.

Опишем адсорбцию лиганда на внекольцевых участках ДНК. Примем, что одна молекула лиганда при связывании с линейными участками ДНК занимает n_1 подряд расположенных мест. Вывод изотермы адсорбции лиганда на ДНК проведем на основе квазихимической модели связывания лиганда с ДНК. Адсорбцию лиганда на ДНК представим как квазихимическую реакцию связывания лиганда (L) из раствора со свободным местом (M) на линейном участке ДНК [9]



где (LM) – комплекс лиганда с ДНК; k_1 и k_{-1} – константы образования и распада комплекса соответственно.

Квазихимическое описание адсорбции лиганда на ДНК позволяет воспользоваться хорошо разработанным аппаратом формальной химической кинетики. Детальное описание процесса адсорбции лиганда на ДНК можно провести в рамках стохастического описания процесса адсорбции [8]. Для стохастического описания связывания лиганда с ДНК введем функцию $w(x_1, t)$ вероятности того, что на ДНК в момент времени t имеется x_1 молекул лиганда. Учитывая, что число связанного лиганда на ДНК может увеличиться или уменьшиться на единицу, можно записать следующее уравнение, описывающее изменение $w(x_1, t)$ со временем в виде [3,13]

$$\frac{\partial w(x_1, t)}{\partial t} = t^+(x_1 - 1) \cdot w(x_1 - 1, t) + t^-(x_1 + 1) \cdot w(x_1 + 1, t) - (t^+(x_1) + t^-(x_1)) \cdot w(x_1, t), \quad (2)$$

где $t^+(x_1)$ и $t^-(x_1)$ – вероятности переходов в единицу времени из состояния x_1 в состояние $x_1 + 1$ и из x_1 в $x_1 - 1$ соответственно. Уравнение (2) позволяет вычислить наиболее важные статистические параметры связывания. Умножив обе части уравнения (2) на x_1^k и просуммировав по всем k , можно получить следующее уравнение для моментов $\bar{Y}x_1^k$:

$$\frac{d\bar{x}_1^k}{dt} = \bar{t^+(x_1)((x_1 + 1)^k - x_1^k)} + \bar{t^-(x_1)((x_1 - 1)^k - x_1^k)}. \quad (3)$$

Из (3) при $k=1$ получим уравнение для среднего числа лигандов, связанных с ДНК, в виде

$$\frac{d\bar{x}_1}{dt} = \bar{t}^+(x_1) - \bar{t}^-(x_1). \quad (4)$$

Вероятности переходов в единицу времени $t^+(x_1)$ и $t^-(x_1)$ вычислим на основе результатов работ [12,15,16], в которых приведен подробный вывод $t^+(x_1)$ и $t^-(x_1)$ для различных типов реакций. Основываясь на этих работах, для квазихимической реакции (1) можно записать

$$t^+(x_1) = k_1 c_f (N_1 - (2n_1 - 1)x_1), \quad (5)$$

$$t^-(x_1) = k_{-1} x_1, \quad (6)$$

где c_f – число лигандов в растворе. Подставив (5) и (6) в (4), получим следующее уравнение, описывающее изменение во времени среднего числа лигандов на ДНК при малых заполнениях:

$$\frac{d\bar{x}_1}{dt} = k_1 c_f (N_1 - \bar{x}_1 (2n_1 - 1)) - k_{-1} \bar{x}_1. \quad (7)$$

Принимая, что в начальный момент времени на ДНК нет адсорбированных лигандов, т.е. при условии $x_1(0) = 0$, нетрудно решить уравнение (7). Можно показать, что это решение имеет вид

$$\bar{x}_1(t) = \frac{K_1 c_f N_1}{1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f} [1 - \exp(-(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)t)], \quad (8)$$

где $K_1 = k_1 / k_{-1}$ – константа равновесия реакции (1). Из (8) можно получить стационарное значение среднего числа связанных с ДНК лигандов, т.е. изотерму адсорбции лигандов с ДНК при малых заполнениях:

$$\bar{x}_1 = \frac{K_1 c_f N_1}{1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f}. \quad (8a)$$

Аналогичным образом можно показать, что изотерма адсорбции лигандов на кольцевых участках ДНК имеет вид

$$\bar{x}_2 = \frac{K_2 c_f N_2}{1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f}, \quad (9)$$

где $\bar{x}_1$ – среднее число лигандов на кольцевых участках ДНК, n_2 – число мест на кольцевых участках ДНК, с которыми связывается одна молекула лиганда, K_2 – константа равновесия при связывании лиганда с кольцевым участком ДНК. Поскольку адсорбция лигандов на кольцевых и линейных участках ДНК идет независимо, то можно написать $x = x_1 + x_2$ и далее $\bar{x} = \bar{x}_1 + \bar{x}_2$.

Учитывая (8a) и (9), для окончательного выражения среднего числа адсорбированных на ДНК лигандов имеем

$$\overline{x} = \frac{K_1 c_f N_1}{1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f} + \frac{K_2 c_f N_2}{1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f}. \quad (10)$$

Используя уравнение (3), можно вычислить дисперсию числа адсорбированных на ДНК лигандов $\overline{\Delta x^2}$. Поскольку адсорбция лигандов на кольцевую и внекольцевую ДНК идет независимо, то можно написать $\overline{\Delta x^2} = \overline{\Delta x_1^2} + \overline{\Delta x_2^2}$

При вычислении дисперсии $\overline{\Delta x^2}$ будем исходить из ее определения $\overline{\Delta x_1^2} = \overline{x_1^2} - (\overline{x_1})^2$

Подставив $k = 2$ в уравнение (3), нужно определить $\overline{\Delta x_1^2}$, а затем, используя (8), после несложных, но громоздких вычислений можно получить следующее окончательное выражение для нестационарной дисперсии:

$$\begin{aligned} \overline{\Delta x_1^2}(t) = & \frac{K_1 c_f N_1 (1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} \cdot (1 - \exp(-(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)k_{-1}t)) + \\ & + \frac{(K_1 c_f)^2 N_1 (2n_1 - 1)}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} \cdot (1 - \exp(-2(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)k_{-1}t)) \end{aligned} \quad (11)$$

Из формулы (11), устремив время к бесконечности, получим стационарную дисперсию в виде

$$\overline{\Delta x_1^2}(t) = \frac{K_1 c_f N_1}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} \quad (12)$$

Выражения для нестационарной и стационарной дисперсии при адсорбции на кольцевых ДНК можно получить аналогичным образом. Эти выражения совпадают с (11) и (12) с точностью до замены индекса 1 на индекс 2. Так, стационарная дисперсия при адсорбции на кольцевых ДНК равна

$$\overline{\Delta x_2^2}(t) = \frac{K_2 c_f N_1}{(1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f)^2}. \quad (13)$$

Учитывая (12) и (13), получим следующее окончательное выражение для стационарной дисперсии числа адсорбированных на ДНК лигандов:

$$\overline{\Delta x^2} = \frac{K_1 c_f N_1}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} + \frac{K_2 c_f N_1}{(1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f)^2}. \quad (14)$$

Результаты и обсуждение. Рассматриваемая в данной работе адсорбция при малых заполнениях представляет интерес по ряду причин. Хорошо известно, что при анализе экспериментальных данных по адсорбции лигандов на ДНК важным является достижение состояния, когда все места на ДНК полностью заняты лигандами.

Однако в ряде случаев из-за слабого связывания лиганда с ДНК не удается достичь полностью связанного состояния [10,11]. Отметим, что во всех случаях достижение полностью связанного состояния связано с затратами большого количества ДНК. Заметим также, что малые заполнения не только позволяют относительно просто описать процесс адсорбции, но имеют и самостоятельный интерес. В условиях реальной клеточной системы в подавляющем большинстве случаев заполнение лигандами ДНК можно считать малым. Малые заполнения представляют интерес еще и потому, что малое количество лигандов на ДНК при прочих равных условиях слабо возмущает систему, и полученные результаты адекватно описывают систему.

При обработке экспериментальных данных наиболее часто используется изотерма адсорбции. Для анализа полученной нами изотермы адсорбции (10) перепишем ее в виде

$$r = \frac{K_1 c_f (1-p)}{1 + (2n_1 - 1) K_1 c_f} + \frac{K_2 c_f p}{1 + (2n_2 - 1) K_2 c_f}, \quad (10a)$$

$$r = \bar{x} / N, \quad p = N_2 / N$$

где r – число адсорбированных лигандов, приходящееся на одну пару оснований, p – доля от полного числа пар оснований, находящихся в кольцевой ДНК. Рассмотрим, как изменяется вид изотермы адсорбции лигандов при связывании *cis*-DDP с ДНК. Как правило, сопоставление экспериментальных данных с теоретической изотермой проводится в координатах Скэтчарда. Изотерму адсорбции лигандов до связывания *cis*-DDP с ДНК можно получить из (10a), подставив в нее $p = 0$. В координатах Скэтчарда эта изотерма линейна и имеет вид

$$\frac{r}{K_1 c_f} = 1 - \alpha_1 r, \quad \alpha_1 = 2n_1 - 1. \quad (15)$$

Можно показать, что в координатах Скэтчарда изотерма (10a) имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{r}{K_1 c_f} = & \frac{1 - \alpha_1 r - \gamma \alpha_2 r + p(\gamma - 1)}{2} + \\ & + \sqrt{\frac{(1 - \alpha_1 r - \gamma \alpha_2 r + p(\gamma - 1))^2}{4} - \gamma r (\alpha_1 \alpha_2 r - \alpha_2 - p(\alpha_1 - \alpha_2))} \end{aligned} \quad (16)$$

$$\alpha_2 = 2n_2 - 1, \quad \gamma = K_2 / K_1$$

Как видно из (16), при появлении кольцевых участков на ДНК изотерма адсорбции в координатах Скэтчарда становится нелинейной. Это обстоятельство продемонстрировано на рис.1. Кривая 1 на рис.1 изображает линейную изотерму (15) и соответствует случаю адсорбции лигандов на чистой ДНК при малых заполнениях, т.е. на ДНК нет молекул *cis*-DDP. Принято, что при связывании лиганда с ДНК лиганд занимает $n_l = 2$ пары оснований.

Кривая 2 отвечает случаю, когда в результате связывания ДНК с *cis*-DDP на ДНК образовались кольцевые участки, адсорбционные свойства которых отличны от адсорбционных свойств чистой ДНК. Доля кольцевых структур на кривой (2) равна $p = 0,1$, число пар оснований, с которыми связывается одна молекула лиганда, равна $n_2 = 3$, и константа связывания на кольцевом участке на порядок больше, чем на чистой ДНК ($\gamma = 10$). Отметим, что сумма двух линейных изотерм адсорбции в координатах Скэтчарда может привести к нелинейной изотерме [6].

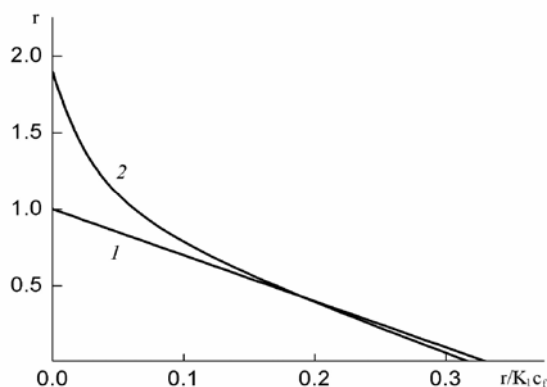


Рис 1. Изотермы адсорбции лиганда на ДНК:

1 – ДНК без *cis*-DDP, 2 – ДНК, содержащая *cis*-DDP. Кривая 1 построена при $n_1 = 2$; кривая 2 – при $n_1 = 2$, $n_2 = 3$, $p = 0.1$, $\gamma = 10$.

При связывании *cis*-DDP с ДНК изменяется также и дисперсия адсорбированных на ДНК лигандов. Это видно из анализа (14) и продемонстрировано на рис.2. Из рис.2 видно, что дисперсия адсорбированных лигандов на чистой ДНК (кривая 1) имеет вид кривой с максимумом. Наличие максимума характерно для зависимости дисперсии от концентрации лигандов [8,9].

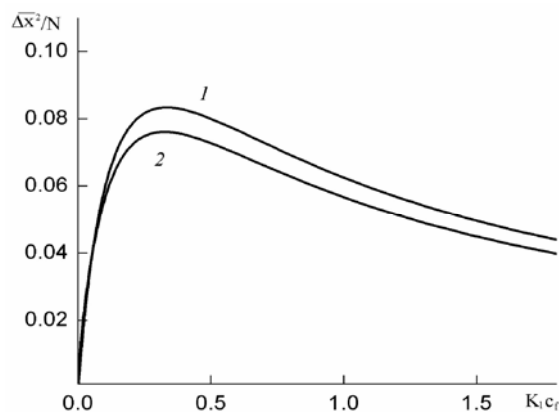


Рис 2. Дисперсия числа адсорбированных на ДНК лигандов:

1 – ДНК без *cis*-DDP, 2 – ДНК, содержащая *cis*-DDP.

Параметры для кривых 1 и 2 те же, что и на рис.1.

При связывании *cis*-DDP с ДНК часть ДНК оказывается в кольцевой структуре с иными адсорбционными свойствами, чем на чистой ДНК. И поскольку мы приняли, что в кольцевой ДНК число пар оснований, с которыми связывается одна молекула лиганда, больше, чем на чистой ДНК, то согласно [9], это должно привести к уменьшению максимума дисперсии и смещению координаты максимума в сторону меньших концентраций лиганда, что и видно на рис.2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян С. Г., Мамасакхисов Е.Ш., Морозов В.Ф., Далян Е.Б., Хачикян Р.Е., Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Ориоли П., Бруни Б. Биофизика, 42, 2, 372, 1997.
2. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суровая А.Н., Мол. биол., 32, 855, 1998.
3. Ван Кампен Н.Г. Стохастические процессы в физике и химии. М., Высш. шк. 1990.
4. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. Биофизика, 48, 4, 644, 2003.
5. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. Мол. биол., 31, 2, 263, 1997.
6. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М., Мир, 1985. т.3.
7. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodriguez E., Manzano J.L. Anal. Biochem., 355, 157, 2006.
8. Arakelyan V.B., Babayan S.Yu., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. J. Biomol. Str. Dyn., 23, 4, 479, 2006.
9. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G.G. J. Biomol. Str. Dyn., 18, 2, 231, 2000.
10. Babayan Yu.S., Manzini G., Quadrifoglio F. Mol. Biol. (Russian), 22, 898, 1988.
11. Babayan Yu.S., Manzini G., Quadrifoglio F. Nucleic Acids Res., 15, 5803, 1987.
12. Bartholomay A.F. Biochemistry, 1, 223, 1962.
13. Gardiner C.W. Handbook of stochastic methods, Springer, Verlag, Berlin, 1985.
14. Hambley T.W. J. Chem. Soc. Dalton Trans, 2711, 2001.
15. Heyde C.C., Hedy E. J. Theor.Biol., 25,159, 1969.
16. McQuarrie D.A., Keiser J. Theoretical chemistry 9: Advance and Perspectives. N.-Y., V.6A, 165, 1981.
17. Sundquist W.I., Lippard S.J. Coordin. Chem. Rev., 100, 293, 1990.
18. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. J. Biomol. Str. Dyn., 25, 6, 641, 2008.

Поступила 10.07. 2008