



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

## ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПОДОФИЛЛОТОКСИНА И ЭТОПОЗИДА С ДНК МЕТОДОМ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.П. АНТОНЯН<sup>1</sup>, А.С. РЯЗАНОВА<sup>2</sup>, Р.Р. ВАРДАПЕТЯН<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ереванский госуниверситет, биологический факультет, кафедра биофизики  
<sup>2</sup>Российско-армянский (Славянский) университет, медико-биологический факультет

Методом спектрофотометрического титрования исследовано комплексобразование подофиллотоксина и его полусинтетического производного - этопозида с ДНК различного ГЦ-содержания. Получены значения константы ( $K_{св}$ ) и числа мест ( $n$ ) связывания этих лигандов с ДНК. Обнаружено, что оба лиганда предпочтительнее связываются с ДНК с высоким АТ содержанием. Выявлено, что оба лиганда с ДНК связываются более чем одним способом. Показано, что  $K_{св}$  этопозида с ДНК имеет большее значение, чем  $K_{св}$  подофиллотоксина.

*ДНК - подофиллотоксин (Ртох) – этопозид - спектры поглощения  
- преобразование Скетчарда*

Ջեռագրովել է տարբեր GC -պարունակությամբ ԴՆԹ-ների հետ պոդոֆիլոտոքսինի և նրա կիսասինթետիկ ածանցյալի էտոպոզիդի կոմպլեքսագոյացումը սպեկտրոֆոտոմետրիկ տիտրման մեթոդով: Ստացվել են ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդների կապման հաստատունի ( $K_{св}$ ) և կապման տեղերի թվի ( $n$ ) արժեքները: Ցույց է տրվել, որ երկու լիգանդներն էլ նախընտրելիորեն կապվում են բարձր АТ-պարունակությամբ ԴՆԹ-ի հետ: Բացահայտվել է, որ երկու լիգանդները ԴՆԹ-ի հետ կապվում են մեկից ավելի եղանակներով: Ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի հետ էտոպոզիդի կապման հաստատունը ավելի մեծ արժեք ունի, քան պոդոֆիլոտոքսինի դեպքում:

*ԴՆԹ – պոդոֆիլոտոքսին (Ртох) – էտոպոզիդ – կլանման սպեկտրներ –  
Սկետչարդի ձևափոխում*

The complex formation of podophyllotoxin and its semi synthetic derivative – etoposide with DNA of different GC-content has been investigated by the spectrophotometric titration method. The values of binding constant ( $K_b$ ) and number of binding sites ( $n$ ) of these ligands with DNA have been received. It has been revealed, that both ligands preferably bind with DNA of high AT-content. It has been shown, that the value of  $K_b$  of etoposide with DNA is higher, than in the case of podophyllotoxin.

*DNA – podophyllotoxin (Ptox) – etoposide – absorption spectra – Scatchard transformation*

Взаимодействие низкомолекулярных веществ – лигандов с ДНК исследуется различными методами (абсорбционным, флуориметрическим, ЯМР и т.д.), которые позволяют обнаружить не только структурные особенности комплексов, но и определить термодинамические параметры связывания [3,9,16]. При этом, для анализа экспериментальных данных по адсорбции лигандов на макромолекуле важным является достижение состояния, когда все места на макромолекуле, доступные для связывания, полностью заняты лигандом [21].

Известно, что подофиллотоксин (Ptox) и его синтетические и полусинтетические производные обладают биологической активностью и проявляют цитотоксичность, подавляя процесс удвоения ДНК посредством связывания с топоизомеразы I и II ДНК [4-5,7-8,10-11,14,20,22]. Однако в последнее время выявлено, что Ptox и его синтетические и полусинтетические производные, в частности этопозид, способны также непосредственно связываться с ДНК [8,27].

Лиганды связываются с ДНК ковалентно (некоторые металлсодержащие соединения, например, *cis*-диаминодихлоролатиний – *cis*-DDP) или нековалентно [6,12,15,17,23] различными механизмами – интеркаляционным, внешним или электростатическим и могут проявлять специфичность к определенным последовательностям или участкам ДНК [1-2,13,18-19,24-26]. Так, Hoechst 33258 (H33258) связывается внешне в малом желобке ДНК и проявляет ярко выраженную специфичность к АТ-последовательностям [13,18-19], бромистый этидий (БЭ) интеркалирует в плоскость пар оснований предпочтительно к пиримидин-пуриновым последовательностям [1-2,24-26].

Часто спектральные характеристики связанных и несвязанных молекул лигандов с ДНК существенно различаются, что позволяет определить термодинамические параметры - константу и число мест связывания при изучении взаимодействия лигандов с ДНК [1,25]. Целью данной работы явилось исследование взаимодействия подофиллотоксина и этопозиды с ДНК методом абсорбционной спектроскопии.

**Материал и методика.** В работе были использованы Ptox («Merk» Германия), эпиподофиллотоксин (этопозид) (ICN, Biomedicals, США), ДНК *Scotridium perfringens* (среднее ГЦ-содержание ХГЦ=32%), тимуса теленка (Calf Thymus) СТ (ХГЦ=42%), *M. Lysod.* (ХГЦ=712%) (Sigma, США). Соответствующие концентрации лигандов и ДНК получали путем разбавления маточных растворов. Маточные растворы лигандов готовили путем взвешивания сухих препаратов с последующим растворением в метаноле. Маточные растворы ДНК получали растворением сухих препаратов в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Соответствующие концентрации ДНК определяли с помощью следующих коэффициентов экстинкции:  $\epsilon_{260} = 7400 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для *Cl. perfr.* и  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для Calf Thymus и *M. Lysod.* В разработанной нами системе Ptox свободно растворяется в широком спектре концентраций в Na-фосфатном буфере. Все препараты были использованы без дополнительной очистки.

При исследовании раствор Ptox или этопозид титровали раствором ДНК в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Спектры поглощения комплексов были получены в интервале длин волн -  $220 \leq \lambda \leq 800 \text{ нм}$ . Максимум поглощения раствора чистого лиганда соответствовал  $\lambda = 290 \text{ нм}$ , в то время как максимум поглощения полностью связанных с ДНК молекул лиганда соответствовал  $\lambda = 292 \text{ нм}$ . При регистрации поглощения комплексов Ptox или этопозид с ДНК концентрация лиганда оставалась постоянной, а концентрационное соотношение  $r_b$  изменялась в интервале -  $0 \leq r_b \leq 0,5$ , где  $r_b = \text{лиганд/ДНК}$  (рас-считано на пару оснований ДНК).

На основании спектров поглощения определены параметры связывания из кривой адсорбции в координатах Скетчарда, построенных по уравнению [25]:

$$r/C_f = K(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} \quad (1)$$

При малых заполнениях кривая связывания имеет линейный вид

$$\frac{r}{c_f} = K(1 - (2n - 1)r) \quad (2)$$

где  $r$  - число лигандов, приходящее на одно место связывания,  $C_f$  - концентрация лигандов в растворе,  $K$  - константа связывания [3]. Сопоставив формулу (2) с экспериментальными данными, можно определить  $K$  и  $n$ . Для получения  $r/C_f$  и  $r$  из спектров поглощения комплексов ДНК-лиганд определяли концентрацию несвязанного лиганда  $C_f$  с помощью уравнения:

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{A - A_{\infty}}{A_0 - A_{\infty}}, \quad (3)$$

где  $A$  - поглощение комплекса при данной концентрации лиганда,  $A_0$  и  $A_{\infty}$  - поглощение полностью свободного и связанного лигандов,  $C_0 = C_f + C_b$  - полная концентрация лиганда в растворе;  $\tau = C_b/C_f$ ;  $C_b$  - концентрация связанного лиганда,  $C_p$  - концентрация фосфатных групп ДНК.

*Приборы.* Спектрофотометрические измерения проводили на двулучевом спектрофотометре UV-VIS UNICAM-SP8-100 (Англия). Измерение поглощения осуществляли в герметически закрытых кварцевых кюветках длиной оптического пути 1 см. Средняя чувствительность прибора в рабочем диапазоне спектра, измеренная без образцов, равна  $5 \cdot 10^{-5}$  единиц оптической плотности. Это соответствует изменению  $\Delta I/I = 10^{-4}$ , что в конечном итоге дает общую погрешность, не превышающую 3%.

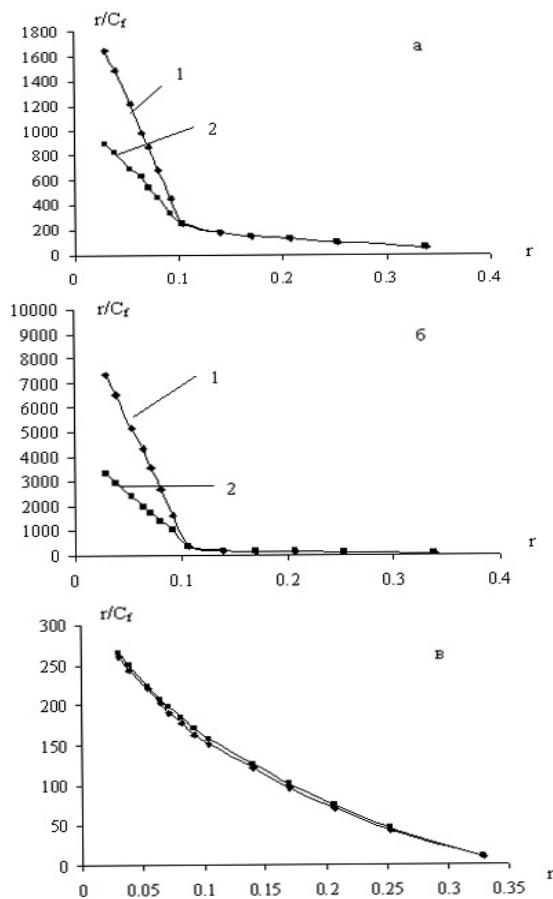
Спектрофотометрическое титрование растворов осуществляли микропипеткой с общим объемом 10 мкл ("Hamilton", США).

Значения поглощения образцов выводились на дисплей компьютера с помощью программы, обработанной доц. В. Элбакяном в среде программирования LabVIEW 7.0.

**Результаты и обсуждение.** Исследования взаимодействия лигандов с ДНК методом абсорбционной спектроскопии основаны на том, что зачастую спектры поглощения комплексов проявляют батохромный сдвиг в сторону более длинных волн по сравнению со спектром поглощения чистого лиганда и гипохромное уменьшение максимумов в интервале изменения длины волны в полосе поглощения данного лиганда (например, интеркаляторов, в частности в случае БЭ). Такая особенность спектральных характеристик лигандов при взаимодействии с ДНК позволяет провести количественный анализ экспериментальных данных при спектрофотометрическом титровании раствора лиганда раствором ДНК и на их основании построить кривую связывания.

Спектры поглощения растворов комплексов Ptoх и этопозид с ДНК зарегистрированы в интервале длин волн  $220 \leq \lambda \leq 400$  нм (спектры не приведены). Необходимо отметить, что максимумы спектров поглощения лигандов при  $\lambda = 290$  нм уменьшаются по мере увеличения концентрации ДНК при титровании растворов Ptoх и этопозид. При этом, во избежание разбавления раствора лиганда при титровании с раствором ДНК, в исследуемые образцы одновременно было добавлено соответствующее количество лиганда. Следовательно, уменьшение максимумов спектров комплексов обусловлено связыванием лигандов с ДНК, вследствие чего концентрация свободных молекул лиганда уменьшается, что приводит к соответствующему уменьшению поглощения. Из значений поглощений комплексов Ptoх-ДНК и этопозид-ДНК определены значения  $\tau$  и  $C_f$  и получены кривые связывания, приведенные на рис.1. Как видно из рисунка, кривые связывания нелинейные в случае ДНК *Cl. perfr.* и *Calf thymus*, в то время как в случае ДНК *M. lysod.* кривая связывания прямолинейная. Нелинейные кривые связывания Ptoх и этопозид с ДНК *Cl. perfr.* и *Calf thymus* указывают на то, что имеет место, по крайней мере, два способа связывания, один из которых сильный (специфический), другой – слабый (неспецифический), в то время как в случае ДНК *M. lysod.* взаимодействие происходит одним способом [25].

На наличие специфического и неспецифического способов взаимодействия указывает тот факт, что наклон кривой при сильном связывании Ptoх с ДНК *Cl. perfr.* и *Calf thymus* меньше, чем наклон кривой при связывании этопозид с этими ДНК. В то же время участки на кривых, соответствующие слабому связыванию обоих лигандов с ДНК, совпадают друг с другом, а также с кривой связывания и Ptoх, и этопозид в случае ДНК *M. lysod.*, что является подтверждением неспецифического связывания этих лигандов с ДНК и не зависит от нуклеотидного содержания нуклеиновой кислоты.



**Рис.1.** Кривые связывания Ptox (а) и этопозид (б) с ДНК *Cl. perfr.* (1) и *Calf thymus* (2), а также Ptox и этопозид с ДНК *M. lysod.* (в) в координатах Скетчарда.

На основании кривых связывания этих лигандов с ДНК получены значения параметров связывания –  $K$  и  $n$ , которые обобщены в табл. 1. Как видно из полученных данных, при специфическом связывании этих лигандов с ДНК соотношение констант связывания  $K_{\text{этоп.}}/K_{\text{Ptox}} \approx 5$  (табл.1). Этот результат указывает на то, что полусинтетическое производное этопозид прочнее связывается с ДНК, чем подофиллотоксин. Интересным является тот факт, что аналогичные результаты получены в случае ДНК *Cl. perfr.* и *Calf thymus* (рис. 1, а и б), в то время как в случае ДНК *M. lysod.* специфическое связывание не обнаруживается, а кривые связывания обоих соединений практически совпадают друг с другом (рис. 1, в). Более того, сродство этих лигандов к ДНК *M. lysod.* намного меньше, чем с ДНК *Cl. perfr.* и *Calf thymus* ( $K \approx 103$ ), что указывает на то, что специфическими местами для связывания подофиллотоксина его производных являются АТ-богатые участки ДНК.

Неспецифическое же связывание Ptox и этопозид с ДНК *Cl. perfr.* и *Calf thymus*, а также с ДНК *M. lysod.*, по всей вероятности, происходит за счет взаимодействия с сахаро-фосфатным остовом, вследствие чего значения  $K$  совпадают друг с другом, как в случае ДНК различного ГЦ-содержания, так и в случае Ptox и этопозид.

Значения же  $n_c$  в случае обоих лигандов практически совпадают, то есть число мест при специфическом связывании зависит не от типа лиганда, а от последовательности нуклеотидов в этих участках. На это указывает тот факт, что значения  $n_{nc}$ , полученные для второго способа связывания Ptox и этопозид с ДНК Cl. perfr. и Calf thymus, а также значение  $n_c$ , полученное для комплексов этих лигандов с ДНК M. lysod., совпадают.

**Таблица 1.** Значения константы K и числа мест  $n$  связывания Ptox и этопозид с ДНК различного ГЦ-содержания

ДНК	Ptox				Этопозид			
	$K_c$ , $10^4 M^{-1}$	$K_{nc}$ , $10^4 M^{-1}$	$n_c$	$n_{nc}$	$K_c$ , $10^4 M^{-1}$	$K_{nc}$ , $10^4 M^{-1}$	$n_c$	$n_{nc}$
Cl. perfr.	$2,2 \pm 0,0$ 2	$0,31 \pm 0,00$ 3	5,0	1,5	$10,0 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,003$	5,0	1,5
Calf thymus	$1,1 \pm 0,0$ 1	$0,32 \pm 0,00$ 3	4,0	1,5	$4,5 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,003$	4,5	1,5
M. lysod.	-	$0,31 \pm 0,00$ 3	-	2,0	-	$0,32 \pm 0,003$	-	2,0

$K_c$  - значения K при специфическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

$K_{nc}$  - значения K при неспецифическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

$n_c$  - значения  $n$  при специфическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

$n_{nc}$  - значения  $n$  при неспецифическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что подофил-лотоксин и его полусинтетическое производное этопозид связываются с ДНК двумя способами: с ярко выраженной специфичностью к АТ-последовательностям и ограниченными местами связывания и неспецифически.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. Связывание БЭ с однопочечной ДНК. Биофизика, 48, 4. С. 644-647, 2003.
2. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Пирумян К.В., Бояджян З.Р., Карапетян А.Т. Влияние ионной силы на взаимодействие Hoechst 33258 с ДНК. Вестник МАНЭБ, 2005, том 10, N 5, вып. 2, стр. 145-150.
3. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions. J.Biomol. Struct. Dyn., 18, 2. p. 231-235, 2000.
4. Anyanwutaku I.O., Guo X., Chen H.X., et al. Activities of novel nonglycosidic epipodophyllotoxins in etoposide-sensitive and resistant variants of human KB cells, P-388 cells, and in vivo multidrug-resistant murine leukemia cells. Mol. Pharmacol, 49, p. 721-726, 1996.
5. Allevi P., Anastasia M., Ciuffreda P., Bigatti E., Macdonald P. Stereoselective glucosidation of Podophyllum lignans. A new simple synthesis of etoposide. J. Organic Chemistry, 58, p. 4175-4178, 1993.
6. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodriguez E., Manzano J.L. Determination of the DNA-binding characteristics of ethidium bromide, proflavine, and cisplatin by flow injection analysis: Usefulness in studies on antitumor drugs. Anal. Biochem., 355, p. 157-164, 2006.
7. Beers S.A., Imakura Y., Dai H.J., Li D.H., Cheng Y.C., Lee K. Antitumor agents, 99. Synthetic ring C aromatized podophyllotoxin analogues as potential inhibitors of human DNA topoisomerase II. J. Nat. Prod. 51, 5, p. 901-906, 1998.

8. *Bastow K.F., Wang Hui-Kang, Cheng Yung-Chi, Lee Kuo-Hsiung.* Antitumor agents-CLXXIII. Synthesis and evaluation of camptothecin-4 $\beta$ -amino-4'-O-demethyl epipodophyllotoxin conjugates as inhibitors of mammalian DNA topoisomerases and as cytotoxic agents. *J. Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 5, 8, p. 1481-1488, 1997.
9. *Chaires J.B.* Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers*, 44, p. 201-215, 1998.
10. *Damayanthi Y., Lown J.* Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem.*, 5, p. 205-252, 1998.
11. *Felix C.A.* Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med. Pediatr. Oncol.* 36, 5, p. 525-535, 2001.
12. *Hambley T.W.* Platinum binding to DNA: structural controls and consequences. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, p. 2711-2718, 2001.
13. *Ismail M.A., Rodger P.M., Rodger A.* Drug self-assembly on DNA: sequence effects with trans-bis-(4-N-methylpyridiniumyl)diphenyl porphyrin and Hoechst 33258. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 11, p. 335-348, 2000.
14. *Jyothi P., Jagetia G., Krishnamurthy H.* Evaluation of teniposide (VM-26)-induced toxicity on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology*, 163, 2-3, p. 163-174, 2001.
15. *Jakupec M.A., Galanski M., Keppler B.K.* Tumor-inhibiting platinum complexes: state of the art and future perspectives. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 146, p. 1-53, 2003.
16. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 33, 3, p. 255-306, 2000.
17. *Lippert B.* Cisplatin, Wiley-VCH, Zurich, Switzerland, 1999.
18. *Loontjens F.G., Refenfass P., Zechel A., Dumortier L., Clegg R.M.* Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(AT)], and d(CCGGAATCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry*, 29, p. 9029-9039, 1990.
19. *Loontjens F.G., McLaughlin L.W., Diekmann S., Clegg R.M.* Binding of Hoechst 33258 and 4',6-diamino-2-phenylindole to self-complementary decadeoxynucleotides with modified exocyclic base substituents. *Biochemistry*, 30, p. 182-189, 1991.
20. *Macdonald T., Lehnert E., Loper J., et al.* On the mechanism of interaction of topoisomerase II with chemotherapeutic agents. In: Potmesil M, Kohn KW editors. *DNA topoisomerases in cancer*. NY: Oxford University Press, p. 199-214, 1991.
21. *Nechipurenko Yu.D., Mikheikin A.L., Streltsov S.A., Zasedatelev A.S., Nabiev I.R.* Mixed mode of ligand-DNA binding results in S-shaped binding curves. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 18, 5, p. 1-7, 2001.
22. *Rubin E., Hait W.* Anthracyclines and DNA intercalators / epipodophyllotoxins / DNA topoisomerases. *Cancer Medicine*, Inc. London. p. 670-679, 2000.
23. *Sundquist W.I., Lippard S.J.* The coordination chemistry of platinum anti-cancer drugs and related compounds with DNA. *Coordination Chem. Rev.*, 100, p. 293-322, 1990.
24. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T.* Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. *Exp. and Mol. Medicine*, 33, 4, p. 205-208, 2001.
25. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T.* The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. *Exp. and Mol. Medicine*, 35, 6, p. 527-533, 2003.
26. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetyan A.T.* Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 25, 6, p. 641-646, 2008.
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide>.

Поступила 05.10.2010.