



Биолог. журн. Армении, 4 (68), 2016

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С АТ- И GC- ПАР ОСНОВАНИЙ ПРИ ПОМОЩИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ КРИВОЙ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

М.А. ТОРОСЯН

*Национальный университет архитектуры и строительства Армении  
megi.torosyan@mail.ru*

Предложен новый метод для выяснения избирательности взаимодействия лигандов с АТ- и GC- нуклеотидными парами ДНК. Рассматривается влияние исследуемого лиганда на термостабильность определенных с различным GC-содержанием блоков одной и той же гетерогенной ДНК. Предложенным способом исследовано взаимодействие мультимодального лиганда митоксантрона (MTX) на нуклеотидные пары ДНК. Показано, что характер взаимодействия MTX с АТ- и GC- парами зависит от относительной концентрации лиганда, причем с увеличением концентрации лиганда наблюдается сильное отклонение термостабильности GC- богатых участков от линейности.

*ДНК- дифференциальная кривая плавления – митоксантрон – температура плавления*

Առաջարկվել է նոր մեթոդ ԴՆԹ-ի АТ և GC զույգ հիմքերի հետ լիգանդների փոխազդեցության ընտրողականության պարզաբանման համար: Ի տարբերություն արդեն գոյություն ունեցող եղանակների, առաջարկված մեթոդում ընտրողականությունը պարզաբանվում է ուսումնասիրելով միևնույն հետերոգեն ԴՆԹ-ի տարբեր GC պարունակությամբ տեղամասերը: Այս մեթոդով ուսումնասիրվել է բազմաբնույթ լիգանդի՝ միտոքսանտրոնի (MTX) փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային զույգերի հետ: Ցույց է տրված, որ նուկլեոտիդային զույգերի հետ MTX-ի փոխազդեցության բնույթը կախված է լիգանդի հարաբերական կոնցենտրացիայի աճի հետ, ընդ որում GC հարուստ տեղամասերի ջերմակայության աճը ոչ զծային է:

*ԴՆԹ-հավման դիֆերենցիալ կոր – միտոքսանտրոն – հավման ջերմաստիճան*

A new method for determination of the affinity of the ligands with АТ- and GC- nucleotide pairs of DNA is suggested. The effect of the testing ligand to the different GC- content blocks of the same heterogen DNA is considered. It is shown that the nature of the mitoxantron(MTX) interaction with АТ- and GC- pairs depends on the relative concentrations of the ligand and significant non linear increases of the thermal stability of GC- rich regions are registered.

*DNA-the differential melting curve – mitoksantron – melting point*

Одним из путей обнаружения особенностей взаимодействия лигандов с нуклеотидными парами является исследование влияния данного лиганда на ДНК из различных источников с определенными последовательностями с различными GC- содержаниями. В ряде случаев выявляются характерные отличия, которые могут быть незначительными и, чтобы избежать систематических ошибок, нужно рассматривать влияние исследуемого лиганда на определенные с различным GC-содержанием участки одной и той же ДНК .

Противоопухолевой препарат митоксантрон (МТХ) с успехом применяется в химиотерапии опухолей [12,6]. Однако до настоящего времени многие вопросы, связанные с механизмами и избирательностью взаимодействия с ДНК, остаются не выясненными. В работах [8,5 ] было показано, что при связывании МТХ с нуклеотидными парами ДНК избирательность почти не наблюдается, хотя в литературе существуют экспериментальные данные, где показано, что взаимодействие с синтетическими полинуклеотидами, содержащими только АТ-пары, слабее, чем с GC-последовательностями [4-7]. Известно, что при слабо проявленной особенности способности взаимодействия с АТ и GC-парами общепринятый способ исследования избирательности связывания иногда приводит к некорректным результатам. В данной работе на примере МТХ предлагается новый способ исследования избирательности связывания лигандов с нуклеотидными парами на примере плавления комплексов МТХ только с одним гетерогенным ДНК тимуса телят.

**Материал и методика.** Использовали ДНК тимуса телят (Sigma) с коэффициентом экстинкции  $\varepsilon_{260}$  (P)=6550 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Все образцы ДНК изучали в цитратно-солевом растворе 0.1SSC (1 SSC =0.15M Na Cl+0.015M цитрат Na), pH=7.3, [Na<sup>+</sup>]=0.0195M. Концентрацию МТХ определяли спектрофотометрически, учитывая, что в мономерном состоянии его коэффициент экстинкции составляет  $\varepsilon_{659}$ =25900 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>[8].

Спектры поглощения и кривые плавления ДНК получали на спектрофотометре Unicam SP 8-100 (Англия). Плавление ДНК осуществлялось при непрерывном нагреве растворов со скоростью ~0,25град/мин. Измерения повторялись 5-6 раз, с последующим усреднением. Точность определения температуры  $\pm 0,05^\circ\text{C}$ , а оптической плотности— $10^{-4}$  оптических единиц.

Предлагаемый метод значительно информативный и позволяет с большой достоверностью обнаружить специфичность связывания взаимодействия мультимодального лиганда МТХ с гетерогенной ДНК тимуса телят. Анализ полученных данных позволяет заключить, что метод довольно универсальный и его можно применять для обнаружения специфичности взаимодействия других мультимодальных лигандов с гетерогенной ДНК.

Дифференциальные кривые плавления (ДКП) были получены путем численного дифференцирования нормированных кривых плавления по специальной программе. Программа предназначена для получения сглаженной нормированной кривой плавления и ее первой производной при трех режимах сглаживания. О достоверности полученных ДКП ДНК можно судить, сравнивая полученные в настоящей работе ДКП с уже полученными другими способами [10].

**Результаты и обсуждение.** ДНК большинства из высших организмов состоят из блоков, последовательность пар нуклеотидов которых близка к случайной [3]. Как правило, их кривые плавления ступенчатые, однако в большинстве случаев, они (ступеньки) на опыте трудно различимы. Это объясняется тем, что блоков со случайными последовательностями довольно много, а GC-содержание таких блоков довольно близко. Обычно в этих случаях производится дифференцирование кривых плавления по температуре. По положению максимумов на ДНК определяется среднее GC-содержание данного участка (набора блоков) ДНК. Наиболее достоверную информацию о нуклеотидном составе ДНК дает метод разложения ДКП на гауссовы составляющие [1].

На рис. 1 приведена ДКП ДНК тимуса телят и ее разложения на 5 гауссовых составляющих. Известно, что каждую гауссовую составляющую можно представить как определенный участок ДНК с некоторым средним GC-содержанием (см. например [11]). Поэтому, изучая поведение этих участков под действием МТХ, на основе полученных данных можно судить об избирательности связывания этого лиганда и с GC-пар основаниями ДНК. Вследствие большого перекрыва-

ния местоположение максимумов первых двух гауссовых составляющих по температурной шкале ( $T_m$ ) не определяется однозначно, и поэтому даже незначительное изменение положения ДКП (в пределах ошибки эксперимента) приводит к разложению с максимумами уже при других температурах.

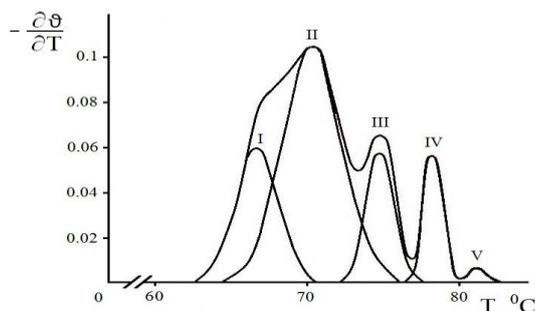


Рис. 1. Дифференциальная кривая плавления ДНК тимуса теленка у ее разложения на 5 гауссовых составляющих.

Четко разделяющиеся третья, четвертая и пятая составляющие можно использовать как участок с квазислучайным распределением нуклеотидных пар с некоторым средним GC-содержанием. Используя формулу (1), зная температуру плавления ( $T_m$ ) составляющих, можно найти среднее GC-содержание данного участка ДНК [10]

$$T_m = 82,1 + \bar{x} (40 - 14 \lg[Na^+]) + 17,3 \lg[Na^+] \quad (1)$$

где  $\bar{x}$  - для GC-содержание участка с температурой плавления  $T_m$ .

Расчеты показывают, что для третьей, четвертой и пятой пиков среднее GC-содержание равно соответственно  $\bar{x}_3 = 0,5$ ,  $\bar{x}_4 = 0,58$  и  $\bar{x}_5 = 0,66$ .

Метод разложения ДКП ДНК используется для выяснения влияния противоопухолевого препарата МТХ на АТ и GC-содержание нуклеотидных пар ДНК. Известно, что МТХ является полуинтеркаляционным соединением. Возможно также внешнее связывание образования стопкообразных структур молекул МТХ вдоль цепи ДНК [4,2]. При таком связывании термостабильность ДНК увеличивается [5,2].

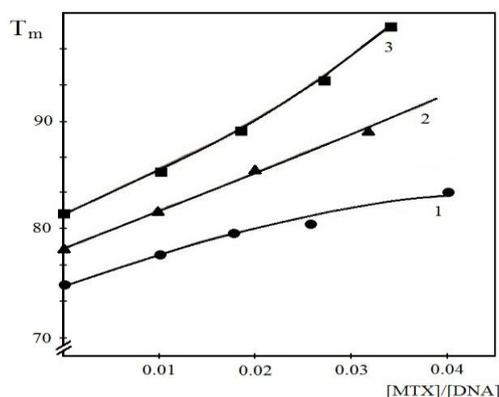


Рис. 2. Зависимость температуры плавления третьей (1), четвертой (2) и пятой (3) составляющих ДКП ДНК от относительной концентрации МТХ.

На рис. 2 показана зависимость  $T_m$  исследуемых составляющих от относительной концентрации МТХ  $\left(\frac{[MTX]}{[DNK]}\right)$ . Как следует из рис. 2, с увеличением концентрации МТХ  $T_m$  увеличивается. Увеличение  $T_m$  гораздо сильнее для GC-богатых блоков. Следовательно, МТХ избирательно влияет на термостабильность AT- и GC- нуклеотидных пар. Из рис. 2 следует, что наклон кривой  $T_m$  от  $\left(\frac{[MTX]}{[DNK]}\right)$  сильно зависит от GC-содержания, причем с увеличением GC-содержания увеличивается тангенс угла наклона. Вероятнее всего, это обусловлено тем, что в зависимости от концентрации лиганда механизмы взаимодействия МТХ с AT- и GC-парами резко отличаются друг от друга [4,7].

Таким образом, обобщая вышеприведённые экспериментальные данные и сравнивая их с литературными данными [8-7], можно заключить, что предложенный подход имеет определённые преимущества по сравнению с другими методами, так как не требует проведения экспериментов с ДНК с разными GC-содержаниями, и избирательность взаимодействия лигандов с AT- и GC-нуклеотидными парами можно выявить непосредственно с прямого эксперимента на гетерогенной ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ахрем А.А., Асланян В.М., Бабаян Ю.С., Ландо Д.Ю.* О причинах несоответствия характеристик первичной структуры ДНК, определенных из кривых плавления и химическими методами, Докл. АН БССР, 24, 3, сс 264-267, 1980.
2. *Бабаян Ю.С., Манзини Дж.* Взаимодействие противоопухолевого соединения митоксантрона с двуспиральными нуклеиновыми кислотами, Мол. биология, 24, 4, сс. 1084-1094, 1990.
3. *Шугалий А.В., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С.* Блочная гетерогенность ДНК из тимуса телят и *E. coli*, Мол. биология, 5, 5, сс. 766-771, 1971.
4. *Awashi P., Dodra S., Barthwal R.* Multispectroscopic methods reveal different modes of interaction of anti cancer drug mitoxantrone with poly (dG-dC), poly(dG-dC) and poly(dA-dT), J. Photochem. Photobiol. B. Biology, 127, pp. 78-87, 2013.
5. *Bhattacharyya J., Basu A., Kuma G.S.* Intercalative interaction of anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA. A calorimetric characterization of the energetics, J. Chem. Thermodynamics, 75, 8, pp. 45-51, 2014.
6. *Carnbleet M.A., Stuart-Harris R.C., Smith I.E., et al.* Mitoxsantrone for the treatment of advance breast cancer: single-agent therapy in previously untreated patients. Eur J. Cancer Oncol., 20, pp. 1141-1146, 1984.
7. *Dogra S., Awashiti P., Tripattis S., Pradeep T. P., Nair M.S., Barthwal R.* NMR-based structure of anticancer drug mitoxantrone stacked with terminal base pair of DNA hexamer sequenece d-(ATCGAT)<sub>2</sub>, J. Biomol. Struct. Dyn., 32, 7, pp. 1164-1183, 2014.
8. *Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z.* Interaction of antitumor agent ametontrone and mitoxantrone with doudle-standed DNA. Biochem. Pharmacology, 34, 24,pp. 4203-4213, 1985.
9. *Lazurkin E.N., Frank-Kamenetskii M.d., Trifonov E.N.* Melting of DNA: its study and application as a research method, Biopolymers, 9, 10, pp. 1253-1306, 1970.
10. *Pavlov V.M., Lyubchenko Yu.L.* A new method for recording DNA differential melting curves, Biopolymers, 17, 3, pp. 795-798, 1978.
11. *Varadwaj P., Misra K., Sharma A., Kumar R.* Mitoxantrone an agent with promises for anticancer therapies. Electronic J. Biology, 6, 2, pp. 36-42, 2010.

Поступила 14.09.2016