



Биолог. журн. Армении, 2 (69), 2017

ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ МИТОКСАНТРОНА С АТ- И GC- ПАРАМИ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

М.А. ТОРОСЯН

*Национальный университет архитектуры и строительства Армении,
кафедра физики и электротехники,
megi.torosyan@mail.ru*

В интервале перехода спираль-кубок комплекса ДНК-митоксантрон были определены изменения поглощения системы на пяти длинах волн. Температуры плавления АТ- и GC- участков были определены при помощи метода наименьших квадратов, принимая, что в процессе плавления вклад этих пар в увеличении поглощения не зависит от нуклеотидной последовательности биополимера. Расчеты показали, что с увеличением концентрации митоксантрона разница между температурами плавления GC- и АТ- участков растет нелинейно, что указывает на избирательность связывания лиганда с этими парами нуклеотидов.

*Митоксантрон-ДНК комплекс – переход спираль-кубок –
температура плавления – избирательность*

ԴՆԹ-միտոքսանտրոն կոմպլեքսի պարույր-կծիկ անցման տիրույթում ալիքի հինգ երկարությունների համար որոշվել են համակարգի կլանման փոփոխությունները: Փոքրագույն քառակուսիների մեթոդով որոշվել են АТ և GC տեղամասերի հալման ջերմաստիճանները ընդունելով, որ հալման պրոցեսի ընթացքում կլանման աճի մեջ այդ զույգերի ներդրումը կախված չէ կենսապոլիմերների ազոտային հիմքերի հաջորդականությունից: Հաշվարկները ցույց են տվել, որ միտոքսանտրոնը ընտրողաբար է փոխազդում АТ և GC զույգ հիմքերի հետ. միտոքսանտրոնի կոնցենտրացիայի աճման հետ ոչ գծային կախվածությամբ աճում է GC և АТ տեղամասերի հալման ջերմաստիճանների տարբերությունը:

*Միտոքսանտրոն-ԴՆԹ կոմպլեքսներ – պարույր-կծիկ անցում –
հալման ջերմաստիճան – ընտրողականություն*

The absorption changes of the DNA-mitoxantrone complexes have been determined for the five wavelengths at the helix-coil transition interval of the system. The melting temperatures of АТ- and GC- pairs have been estimated by the method of least squares assuming that the increase of the absorption was independent on the base sequence of the biopolymer. Calculations showed that the increase of the differences of melting temperatures of АТ- and GC- regions are nonlinear pointing to the selectivity of ligands to those pairs.

Mitoxantrone-DNA complexes – helix-coil transition – melting temperature – selectivity

Взаимодействие низкомолекулярных соединений (НС) с нуклеиновыми кислотами (НК) осуществляется непосредственно, либо путем прямого взаимодействия с различными группами, входящими в состав НК [1, 11, 12], или косвенного влияния в результате изменения структуры и свойства окружающей НК воды [2, 3], либо комбинации обоих этих механизмов [9, 12]. Изменения состояния окружающей НС воды тем самым могут влиять на конформацию и стабильность НК [2, 3]. Возможные структурные изменения НК, которые происходят под действием НС,

приводят к изменению спектров поглощения НК [13, 14], регистрация которых может выявить некоторые особенности комплексообразования.

Известно, что изучение комплексов ДНК·НС при помощи широко применяемой тепловой денатурации ДНК проводится на одной длине волны (в основном максимуме поглощения НК). В этом случае спектральным изменениям ДНК в ходе денатурации добавляются и изменения поглощения НС. Поэтому слежение за денатурацией ДНК в составе комплекса затрудняется. Ранее при изучении плавления ДНК были использованы спектры поглощения, и вычисление параметров плавления проводилось при нескольких длинах волн [14].

В данной работе этот метод был использован для выявления избирательности и связывания противоопухолевого соединения митоксантрона (МТХ) с АТ- и GC- нуклеотидными парами. В результате экспериментальных работ показано, что при увеличении концентрации МТХ четко выявляется избирательность связывания лиганда с нуклеотидными парами ДНК.

Материал и методика. ДНК тимуса теленка и противоопухолевый препарат митоксантрон (МТХ) – препараты фирмы “Sigma”, которые использовали без дополнительной очистки. Измерения проводили в водном растворе, содержащем 0.01 М буфер Трис и 0.1 М NaCl, рН 7,4. Концентрация препаратов была определена спектрофотометрически, с использованием следующих коэффициентов экстинкции ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$): ДНК тимуса теленка ($\epsilon_{260}(\rho) = 6550$) и МТХ ($\epsilon_{659}(\rho) = 21500$) [10]. Спектры поглощения ДНК и комплексов ДНК с МТХ были получены на спектрофотометрах “SPECORD UV/VIS” и “SPECORD M-40”. Оба спектрофотометра были снабжены специальными термостатированными кюветодержателями. В ходе эксперимента температуру кюветодержателей увеличивали ступенчато с интервалами $1-3^{\circ}$ (в интервале плавления ДНК на 1°) при помощи ультратермостата U-1. Измерения проводили с использованием 10мм кварцевых кювет с плотно закрывающимися крышками [1, 8]. Спектры поглощения ДНК и ее комплексов с МТХ были определены в интервале температур $35-95^{\circ}C$ и были построены кривые плавления – зависимость доли расплавленных участков в зависимости от T.

Результаты и обсуждение. Как показали экспериментальные исследования спектров поглощения ДНК в области плавления, а также теоретические расчеты [4, 5, 13], гиперхромный эффект при конформационном переходе спираль-клубок на любой длине волны находится в линейной зависимости от нуклеотидного состава биополимера. Были определены доли денатурированных АТ- и GC- пар оснований по спектрам поглощения комплексов ДНК·МТХ, предполагая, что вклад АТ- и GC- пар в гиперхромность аддитивен и не зависит от соседних пар в цепи двойной спирали ДНК. Тогда измерение поглощения ДНК·МТХ можно представить в виде:

$$\Delta A_{i,j} = \beta_{AT,i} \cdot f_{AT,j} + \beta_{GC,i} \cdot f_{GC,j}, \quad (1)$$

где $f_{AT,j}$ и $f_{GC,j}$ – доля расплавленных АТ- и GC- пар соответственно при температуре j, $\Delta A_{i,j}$ – измерение поглощения при длине волны i и температуре j ($\Delta A_{i,j} = A_{i,j} - A_{i,0}$, где индекс 0 – соответствует температуре, при которой ДНК находится полностью в двуспиральном состоянии). Коэффициенты $\beta_{AT,i}$ и $\beta_{GC,i}$ можно представить:

$$\begin{aligned} \beta_{AT,i} &= c x_{AT} \Delta \epsilon_{AT,i} \\ \beta_{GC,i} &= c x_{GC} \Delta \epsilon_{GC,i} \end{aligned} \quad (2)$$

где c – концентрация ДНК в расчёте на нуклеотидных пар, X_{AT} и X_{GC} молярные доли AT- и GC- пар оснований в исследуемой ДНК, $\Delta\varepsilon_{AT,i}$ и $\Delta\varepsilon_{GC,i}$ – изменения коэффициента экстинкции вследствие денатурации при длине волны i . Уравнение (1) представляет систему линейных уравнений с двумя неизвестными ($f_{AT,j}$ и $f_{GC,j}$), число которых зависит от числа выбранных длин волн (n). В данной работе предлагается следующий способ определения коэффициентов β : при максимальном поглощении (в полностью денатурированном состоянии) $f_{GC} = f_{AT} = 1$, при любых длинах волн в области поглощения. Тогда уравнение (1) примет вид

$$\Delta A_i = cX_{AT} \Delta\varepsilon_{AT,i} + cX_{GC} \Delta\varepsilon_{GC,i} = a\Delta\varepsilon_{AT,i} + b\Delta\varepsilon_{GC,i}, \quad (3)$$

где введены обозначения $a = cX_{AT}$ и $b = cX_{GC}$. Для нахождения параметров a и b составим величину F (формула 4) и минимизируем ее относительно a и b .

$$F = \sum_{i=1}^n [\Delta A'_i - (a\Delta\varepsilon_{AT,i} + b\Delta\varepsilon_{GC,i})]^2, \quad (4)$$

где $\Delta A'_i$ – экспериментальные значения поглощения при полной денатурации ДНК на длине волны i . Из условий $\frac{\partial F}{\partial a} = 0$ и $\frac{\partial F}{\partial b} = 0$ следует:

$$a \sum_{i=1}^n \Delta\varepsilon^2 A_{AT,i} + b \sum_{i=1}^n \Delta\varepsilon_{AT,i} \cdot \Delta\varepsilon_{GC,i} = \sum_i \Delta A'_i \Delta\varepsilon_{AT,i} \quad (5)$$

$$a \sum_{i=1}^n \Delta\varepsilon_{AT,i} \cdot \Delta\varepsilon_{GC,i} + b \sum_{i=1}^n \Delta\varepsilon_{GC,i}^2 = \sum_i \Delta A'_i \Delta\varepsilon_{GC,i}$$

Уравнения (5) представляют линейные уравнения относительно a и b . Зная значения $\Delta\varepsilon_{AT,i}$ и $\Delta\varepsilon_{GC,i}$ (табл. 1), из уравнения (5) можно определить параметры a и b и вычислить величины $\beta_{AT,i} = a\Delta\varepsilon_{AT,i}$ и $\beta_{GC,i} = b\Delta\varepsilon_{GC,i}$. Учитывая результаты работы [14], расчёты проводили для 5 длин волн в области поглощения ДНК: $\lambda=258, 260, 262, 280$ и 282 нм, для которых значения $\Delta\varepsilon_{AT}$ и $\Delta\varepsilon_{GC}$ приведены в табл.1.

Таблица 1. Значение $\Delta\varepsilon_{AT}$ и $\Delta\varepsilon_{GC}$ при некоторых длинах волн [14]

Длина волн λ (нм)	258	260	262	280	282
$\Delta\varepsilon_{AT}$ (М/р)	3277	3318	3298	631	318
$\Delta\varepsilon_{GC}$ (М/р)	1519	1486	1598	2510	2312

Зная значения $\beta_{AT,i}$ и $\beta_{GC,i}$ из уравнения (1) были вычислены значения $f_{AT,j}$ и $f_{GC,j}$ при некоторых относительных концентрациях МТХ. Для нахождения этих величин использован метод наименьших квадратов. Для этого составим величину Q (формула 6)

$$Q = \sum_{i=1}^n [\Delta A'_{i,j} - (f_{AT,j}\beta_{AT,i} + f_{GC,j}\beta_{GC,i})]^2, \quad (6)$$

где $\Delta A'_{i,j}$ – экспериментальное значение изменения поглощения комплексов ДНК·МТХ при длине волны i и температуре j в области плавления ДНК. Выражение Q минимизировали относительно $f_{AT,j}$ и $f_{GC,j}$. Тогда для каждой температуры j получаем систему линейных уравнений.

$$f_{AT,j} \sum_{i=1}^n \beta_{AT,i}^2 + f_{GC,j} \sum_{i=1}^n \beta_{AT,i} = \sum_{i=1}^n \Delta A'_{i,j} \beta_{AT,i} \quad (7)$$

$$f_{AT,j} \sum_{i=1}^n \beta_{AT,i} \beta_{GC,j} + f_{GC,j} \sum_{i=1}^n \beta_{GC,i}^2 = \sum_{i=1}^n \Delta A'_{i,j} \beta_{GC,i}$$

Из уравнений (7) можно вычислить долю расплавленных АТ- и GC- пар оснований (f_{AT} и f_{GC}) при каждой температуре (j) в области перехода спираль-клубок.

Исследования избирательности связывания МТХ с АТ- и GC- парами ДНК из спектров поглощения, полученных в области перехода спираль-клубок по вышеизложенному способу, из спектров поглощения (рис. 1) комплексов ДНК·МТХ была рассчитана зависимость доли расплавленных АТ- и GC- пар оснований от температуры при некоторых концентрациях МТХ.

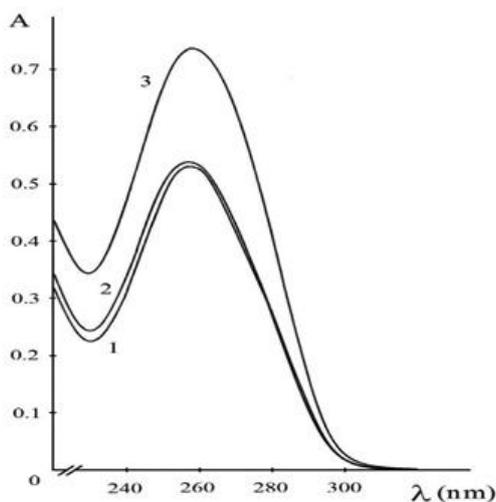


Рис. 1. Спектры поглощения ДНК (1), комплекса ДНК·МТХ (2) в двухспиральном состоянии (при температуре 25⁰С) и комплекса ДНК·МТХ (3) в денатурированном состоянии (при температуре 95⁰С). Концентрации ДНК и МТХ соответственно равны: 8.1·10⁻⁵ М/Р, 2.43·10⁻⁶ М.

Как и следовало ожидать, для всех исследованных концентраций МТХ в интервале плавления ДНК доля расплавленных АТ-пар больше доли $f_{AT}(T)$ и $f_{GC}(T)$ расплавленных GC-пар ($f_{AT,j} > f_{GC,j}$). Для исследования избирательности влияния МТХ на АТ- и GC- нуклеотидные пары из полученных $f_{AT}(T)$ и $f_{GC}(T)$ зависимостей были вычислены температуры (T_{AT} , T_{GC}), где доля расплавленных АТ- и GC- пар оснований равна 0,5. Учитывая полученные результаты, была построена зависимость T_{AT} и T_{GC} от концентрации МТХ (рис. 2).

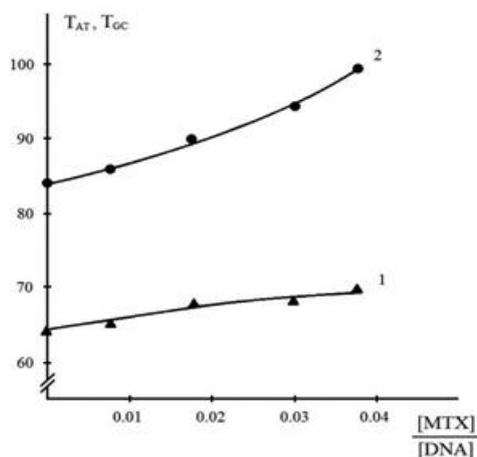


Рис. 2. Зависимость температуры плавления АТ (1) и GC (2) участков ДНК от относительной концентрации МТХ в растворе.

Из рис.2 следует, что с увеличением концентрации МТХ термостабильность АТ- и GC- пар оснований увеличивается. Поскольку с ростом концентрации МТХ разность $T_{GC}([MTX]) - T_{AT}([MTX])$ увеличивается не линейно, можно предполагать, что при связывании МТХ с ДНК термостабильность GC- богатых участков увеличивается больше, чем термостабильность АТ- богатых участков: наблюдается избирательность связывания МТХ с нуклеотидными парами ДНК.

Избирательность связывания МТХ с ДНК исследована также в работах [1, 6, 7] другими способами, причем в работе [6] избирательность связывания исследована нами при помощи дифференциальных кривых плавления, определенных при одной $\lambda=260$ нм длине волны. В работе [6] показано, что с увеличением концентрации МТХ температуры плавления GC- богатых участков ДНК увеличивается больше, по сравнению с АТ- богатыми участками, что вполне согласуется с данными данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаян Ю.С., Манзини Дм.* Взаимодействие противоопухолевого соединения митоксантрона с двуспиральными нуклеиновыми кислотами. Молекуляр. биол., 24, 4, с. 1084-1094, 1990.
2. *Бабаян Ю.С.* Конформация и термостабильность двуспиральных нуклеиновых кислот в водных растворах мочевины. Молекуляр. биол., 22, 5, с. 1204-1210, 1988.
3. *Кондакова Н.В., Целикова С.В., Эйбус Л.Х., Круглова К.Л., Векслер Ф.Б.* Влияние низкомолекулярных аминов на конформацию и стабильность двойной спирали ДНК, Молекуляр. биол., 9, 5, с. 742-746, 1975.
4. *Ряйм Т., Раукас Э.* Изучение комплекса поли-L-гистидина с ДНК методом гипохромных спектров. Молекуляр. биол., 15, 6, с. 1342-1349, 1981.
5. *Ряйм Т., Раукас Э.* Изучение специфики взаимодействия виоламацина В1 с ДНК методом гипохромных спектров. Биофизика, 32, 6, с. 1006-1010, 1987.
6. *Торосян М.* Исследование избирательности связывания лигандов с АТ- и GC- пар оснований при помощи дифференциальной кривой плавления ДНК Биолог. журн. Армении, 4, 68, 81-84, 2016.
7. *Awasti P., Dogra S., Bartwal R.* Multispectroscopic methods reveal different modes of interaction of anticancer drug mitoxantrone with poly(dG-dC)·poly(dG-dC) and poly(dA-dT)·poly(dA-dT). J. Photochem.Photobiol. B.:Biolog., 127, p. 78-87, 2013.

8. Babayan Yu.S., Karapetyan L.G., Kazaryan R.S., Khudaverdyan N.V. Features of the melting of DNA complexes with mitoxantrone at low concentrations. *Biophysics*, 42, 2, p. 347-351, 1997.
9. Baldini G., Varani G. The role of the solvent on the binding of ethidium bromide to DNA in alcohol-water mixtures. *Biopolymers*, 25, 11, p. 2187-2208, 1986.
10. Hakobyan S.N., Shahinyan M.A., Babayan Yu.S. Stabilities of irradiated DNA complexes from sarcoma 45 tumors with mitoxantrone at small fillings. *Biophys Reviews and Let.*, 11, 4, p. 139-147, 2016.
11. Karapetyan A.T., Babayan Yu.S., Torosyan M.A., Shahinyan M.A. Mitoxantrone interaction with poly (G). *Proceeding of the YSU. Phys. Math. Sci.*, 3, p. 49-54, 2015.
12. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dicherson R.E. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc. Nat. Acad. USA*, 82, 3, p. 1376-1380, 1985.
13. Felsenfeld G., Sandeen G. The dispersion of the hyperchromic effect in thermally induced transions of nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, 5, p. 587-610, 1962.
14. Raunas E., Kooly K. Selection of optimal set of wavelengths for analysis of hyperchromic spectra. *Anal. Biochem.*, 66, p. 545-555, 1976.

Поступила 24.03.2017