



Биол. журн. Армении, 4 (73), 2021

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПАР ДНК

Р.С. КАЗАРЯН¹, Л.Р. СОГОМОНЯН², С.А. САРКИСЯН³,
Н.Г. БОЯХЧЯН³, Ю.С. БАБАЯН³

¹ЕГУ, кафедра молекулярной физики,

²Национальный политехнический университет Армении, кафедра физики,

³Национального университета архитектуры и строительства Армении,
кафедра высшей математики и физики
babayanyura@gmail.com

В данной работе предложен метод исследования избирательности влияния факторов различной природы (низкомолекулярные соединения и миллиметровые электромагнитные волны) на термостабильность нуклеотидных пар ДНК, при исследовании характера изменения дифференциальных кривых плавления одной блочной ДНК под действием исследуемых факторов. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, полученных для ДНК с различными GC- содержаниями.

Двухспиральная нуклеиновая кислота – низкомолекулярные соединения – миллиметровые электромагнитные волны – дифференциальная кривая плавления

Ներկա աշխատանքում առաջարկվել է մեթոդ, որը թույլ է տալիս պարզաբանել տարբեր գործոնների (ցածրամոլեկուլային միացություններ և միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ալիքներ) ազդեցությունը ԴՆԹ-ի գույգ հիմքերի վրա՝ ուսումնասիրելով բլոկային կառուցվածքով որևէ ԴՆԹ-ի հալման դիֆերենցիալ կորերի վարքն ուսումնասիրվող գործոնի ազդեցությամբ: Ստացված արդյունքները համընկնում են այլ հեղինակների կողմից տարբեր GC- պարունակությամբ ԴՆԹ-ների վրա կատարված հետազոտությունների հետ:

Երկպարույր նուկլեինաթթու – ցածրամոլեկուլային միացություններ – միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ալիքներ – հալման դիֆերենցիալ կոր

In this work, a method is proposed for studying the selectivity of the influence of factors of various nature (low molecular weight compounds and millimeter electromagnetic waves) on the thermal stability of DNA nucleotide pairs, investigating the nature of the change in the differential curves of melting of one block DNA under the influence of the factors under study. The results obtained agree with the data of other authors obtained for DNA with different GC-contents.

Double stranded nucleic acid – low molecular weight compounds – millimeter electromagnetic waves – differential melting curve

В основе функционирования ДНК лежит способность молекул ДНК изменять свое конформационное состояние под действием различных факторов. В общем случае влияние различных факторов (низкомолекулярные соединения, внешние поля и т.д.) на нуклеиновые кислоты (НК) осуществляется либо непосредственно, путем прямого взаимодействия с различными химическими группами, входящими в состав НК, либо путем косвенного воздействия в результате изменения структуры и свойств воды, либо комбинации обоих этих механизмов.

Изменяя состояние воды, они тем самым могут влиять на конформацию и стабильность НК. Поэтому, исследуя влияние различных внешних факторов на конформационное состояние НК, можно не только выяснить конформационные возможности двойной спирали НК, но и судить о характере влияния этих факторов на структуру воды, что в конечном счете приводит к изменению стабильности нуклеотидных пар НК. Поэтому, исследуя изменение термостабильности ДНК под действием различных факторов физической и химической природы, в частности, противоопухолевых препаратов, метанола, карбамида и нетепловых миллиметровых электромагнитных (ММЭМ) волн можно не только изучить характер изменения термостабильности АТ- и GC- пар оснований двойной спирали ДНК, но и судить о характере влияния этих факторов на структуру воды, что в конечном счете приводит к изменению конформационного состояния молекул ДНК.

В водных растворах карбамида и метанола конформация и термостабильность ДНК изменяется вследствие способности карбамида и метанола образовывать водородные связи с молекулами воды, изменяя ее структуру [2, 8, 12]. Известно, что влияние нетепловых ММЭМ волн на биосистемы и, в частности, на ДНК обусловлено влиянием ММЭМ волн на структуру воды, вызывая уменьшение гидратизации ДНК и ионов Na^+ присутствующих в растворе ДНК [3, 4, 13, 14]. Противоопухолевые антрациклины, проникая в клетку, в основном связываются с нуклеотидами НК [9, 15], тем самым изменяя биохимические свойства НК.

Ранее было показано, что при помощи разложения дифференциальной кривой плавления (ДКП) блочных ДНК на гауссовы составляющие, можно вычислить ряд параметров, характеризующих первичную структуру ДНК [1, 11]. В данной работе указанный способ используется для выяснения избирательности влияния ММЭМ волны, метанола, карбамида и доксорубина на нуклеотидные пары ДНК.

Материал и методика. В работе использовали ДНК тимуса телят ("Sigma"). Спектры поглощения и кривых плавления ДНК получены на спектрофотометрах CARY 219 (США) и SPECORD-UV-Vis. Для снятия кривых плавления ДНК (зависимость поглощения при 260 нм от температуры) обычно использовался непрерывный режим нагрева раствора ДНК со скоростью 0,2-0,3°C/мин. Измерения проводили в термостатированных ячейках, используя 10 мм кварцевые кюветы с плотно закрывающимися крышками. Точность определения температуры 0,05°C, а оптической плотности – 10^{-4} оптических единиц. Измерения проводились в интервале изменения температуры от 20 до 95°C. Кривые плавления каждого образца снимались по 6-8 раз. Из каждой кривой плавления вычисляли нужные параметры, затем они усреднялись. Среднее квадратичное отклонение оценивалось по формуле

$$\sigma = \left(\sum_{i=1}^n \frac{di^2}{n-1} \right)^{\frac{1}{2}},$$

где di – отклонение от среднего арифметического для i -го измерения, n – количество измерений.

Облучение проводили в специальном стеклянном сосуде. Растворы (~4 мл) сверху закрывались прозрачной для излучения тонкой хлорвиниловой пленкой. Толщина облученного образца ~1 мм. Для облучения использовали генератор Г4-141 (Россия). Интервал частоты колебаний для Г4-141 составляет 37,5-53,7 ГГц (плотность потока на месте нахождения образца составляет 0,6 мВт/см²). Водные растворы ДНК, приготовленные для спектрофотометрических измерений, облучались 30, 40, 60, 90 и 120 мин. соответственно с частотой 50,3 ГГц. Данная частота совпадает с резонансной частотой колебаний гексагональных колец молекулярной структуры воды [6].

Исследования проводились в водном растворе, содержащем 0,19 М NaCl, 10 мМ Трис, 0,5 мМ ЭДТА, pH = 7,4. NaCl, ЭДТА, Трис, карбамид и метанол препараты фирмы "Serva". В работе исследовали противоопухолевый препарат доксорубин (ДХ) фирмы

"Sigma". Концентрацию ДНК и ДХ определяли спектрофотометрически с использованием коэффициентов экстинкции, в $M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot l$: ДНК ($\epsilon_{260} = 6550$) и ДХ ($\epsilon_{480}(P) = 11500$).

Результаты и обсуждение. Обычно при исследовании влияния различных факторов на нуклеотидные пары ДНК необходимо исследовать влияние данного внешнего фактора на ДНК из различных источников с различным GC-содержанием. В ряде случаев эти отличия могут быть незначительными и находиться в пределах ошибки эксперимента. Чтобы избежать систематических ошибок предлагается рассматривать влияние исследуемого фактора на определение с различным GC-содержанием при участии одной и той же блочной ДНК, и уже при рассмотрении отдельных участков (с различным GC-содержанием) блочной ДНК судить об избирательности влияния данного фактора. При таком исследовании не возникает трудностей, связанных с получением ДНК с различным GC-содержанием, подбора совершенно одинаковых условий для всех измерений и т.д.. Рассмотрим к какому изменению кривой плавления ДНК приводят внешние факторы, в одинаковой и различной степени изменяющих стабильность АТ и GC пар оснований ДНК. Если внешние факторы меняют стабильность нуклеотидных пар в одинаковой степени, то это должно повышать или понижать термо-стабильность всех участков ДНК и, при этом не меняется последовательность правления блоков. Такие факторы не будут менять распределение спиральных и расплавленных участков вдоль цепи ДНК. Поэтому под действием таких факторов не будет изменяться вид кривой плавления, и соответственно вид ДКП ДНК: под действием таких факторов происходит параллельный перенос ДКП ДНК вдоль оси температур. Если внешние факторы не в одинаковой степени меняют стабильность нуклеотидов или нуклеотидных пар, то термостабильность блоков будут изменяться по-разному, что должно приводить к изменению разницы между температурами плавления блоков отличающихся GC-содержанием. Следовательно, изменится и распределение спиральных и расплавленных участков вдоль цепи ДНК. Под действием таких факторов будет меняться вид кривой плавления, и соответственно, вид ДКП ДНК. Поэтому, рассматривая характер изменения вида ДКП блочных ДНК, например тимуса телят, можно получить информацию об избирательности влияния различных внешних факторов на АТ- и GC- нуклеотидные пары.

Следует отметить, что блоки представляют собой суперпозиции отдельных участков ДНК, распределенных в основном квазислучайным образом вдоль цепи ДНК и имеющих определенное среднее GC- содержание. Если ДНК данного организма имеет блочное строение (как ДНК тимуса телят), то при плавлении ДНК суперпозиции этих участков дают суммарную кривую, которая характерна для ДНК данного организма. Поэтому, наблюдаемые на ДКП ДНК тимуса телят (рис.1) 5 пиков, как таковые, не имеют определенного смысла, каждый из них характеризует плавление определенных участков с близким GC- содержанием. Ранее было показано, что при помощи разложения ДКП ДНК блочного строения на гауссовы составляющие (независимо от способа разложения), можно с большой точностью определить среднее GC- содержание блочных ДНК [1].

На рис.1 приведена ДКП ДНК тимуса телят и ее разложение на 5 гауссовых составляющих. На ДКП ДНК каждую гауссовую составляющую можно представить как суперпозицию определенных участков ДНК с некоторым средним GC- содержанием.

Вследствие большого перекрытия, местоположения максимумов первых двух составляющих по температурной шкале (T_e) не определяются однозначно, и поэтому, даже незначительные изменения ДКП (в пределах ошибки эксперимента) приводят к разложению с максимумами уже при других температурах.

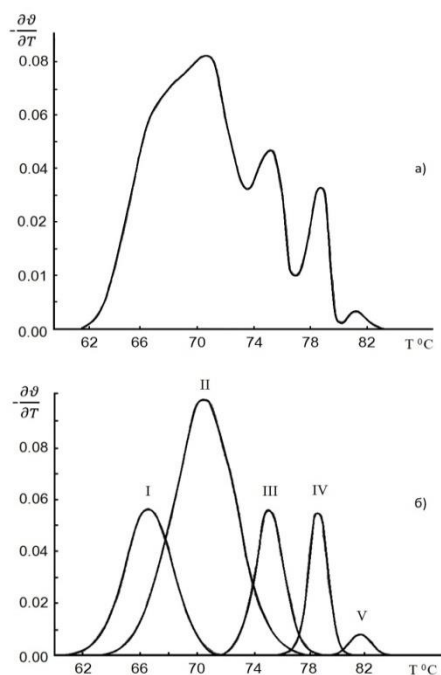


Рис. 1

Рис.1. Дифференциальная кривая плавления ДНК тимуса теленка (а) и ее разложение на 5 гауссовы составляющие (б).

На ДКП ДНК тимуса теленка четко разделяющаяся третья, четвертая и пятая составляющие можно использовать как участки с квазислучайным распределением нуклеотидных пар с некоторым средним GC- содержанием ДНК. Кривая зависимости температуры плавления ДНК от концентрации NaCl в интервале 0,001-0,3 М от GC- содержания ДНК ($\bar{x}$) близка к линейной и хорошо описывается эмпирической формулой (1) [10].

$$T_e = 176 - (2,6 - \bar{x})(36,0 - 7,04 \lg[Na^+]) \quad (1)$$

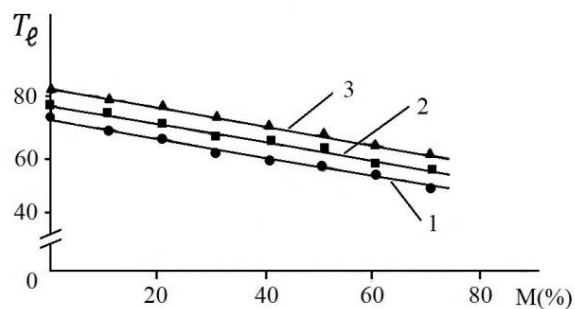


Рис. 2

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

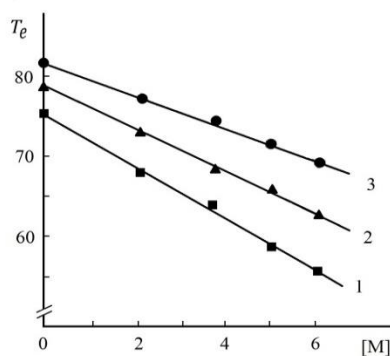


Рис. 3

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

Используя формулу (1), зная температуру плавления (T_e) составляющих можно найти GC- содержание данного участка ДНК. Расчеты показывают, что для указанных составляющих среднее GC- содержание участков ДНК равно соответственно:

$$\overline{x_3} = 0,5, \quad \overline{x_4} = 0,58 \quad \text{и} \quad \overline{x_5} = 0,66.$$

На рис. 2 приведены зависимости температуры плавления составляющих от концентрации метанола. Как следует из рис. 2, вид зависимости T_e от концентрации метанола идентично для трех составляющих, причем зависимости T_e (М) в пределах погрешности эксперимента параллельны. При этом не проявляет избирательности: метанол одинаковым образом дестабилизирует AT- и GC- нуклеотидные пары. Из рис. 3, где показана зависимость T_e от концентрации карбамида, следует, что величина дестабилизации ДНК в присутствии карбамида зависит от GC- содержания. С увеличением концентрации карбамида увеличивается δT_e 2 различных GC- содержащих участков ДНК, причем дестабилизация сильнее для AT- богатых участков. Полученные данные согласуются с литературными данными [2, 7], где также показано, что метанол неизбирательно, а карбамид избирательно дестабилизирует AT- и GC- пар оснований. Более сильная дестабилизация AT- богатых участков, возможно, обусловлена тем, что AT- пары по сравнению с GC- парами больше гидратированы [5, 16].

Метод разложения ДКП ДНК использовался для выяснения влияния ММЭМ волн слабой мощности и противоопухолевого препарата дохорубицина на нуклеотидные пары ДНК. В работах [3, 14] было показано, что облучение ДНК ММЭМ волнами с резонансными частотами колебаний водных молекулярных структур приводит к стабилизации ДНК. Резонансные ММЭМ волны не поглощаются поверхностным слоем воды, а проникают в более глубокие слои жидкости [3, 13]. На рис. 4 показана зависимость T_e исследуемых составляющих от времени облучения растворов ДНК с резонансной частотой 50,3 ГГц. Как следует из рис. 4, при облучении T_e увеличивается. Увеличение T_e сильнее проявляется для AT- богатых более гидратированных участков. Следовательно, ММЭМ волны, изменяя структур связанной воды по-разному влияют на термостабильность AT- и GC- нуклеотидных пар. На рис. 5 приведена зависимость T_e от относительной концентрации дохорубицина в растворе. Из рис. 5 следует, что с увеличением концентрации ДХ T_e составляющих увеличивается, причем зависимость не линейная, увеличение больше для GC- богатых участков.

Следовательно, при взаимодействии ДХ с ДНК наблюдается избирательность связывания с АТ- и GC- пар основаниями: вследствие взаимодействия сильнее изменяется термостабильность GC- богатых участков.

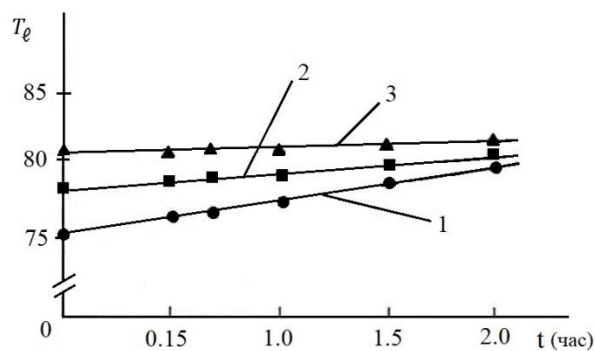


Рис. 4

Рис.4. Зависимость температуры плавления третьей (1), четвертой (2) и пятой (3) составляющих ДКП ДНК тимуса теленка от времени облучения ММЭМ волнами с резонансной 50,3 ГГц частотой.

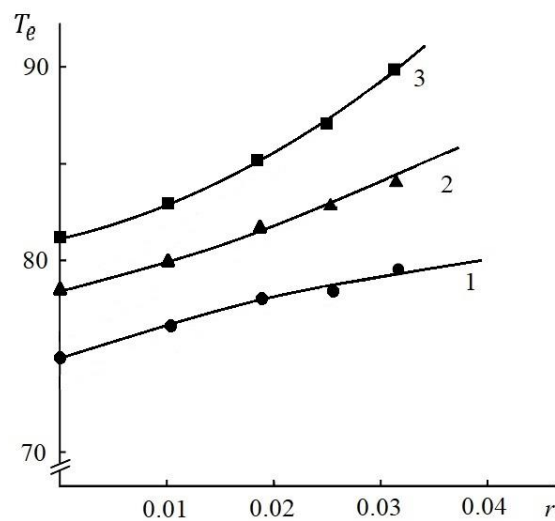


Рис.5

Рис.5. Зависимость температуры плавления третьей (1), четвертой (2) и пятой (3) составляющих ДКП ДНК тимуса теленка от относительной концентрации доксорубцина

$$(r): r = \frac{[ДХ]}{[ДНК]}.$$

Обобщая вышеизложенные данные, можно констатировать, что предложенный подход при исследовании избирательности влияния внешних факторов и низкомолекулярных соединений с АТ- и GC- пар основаниями ДНК имеет определенные преимущества по сравнению с другими методами, так как не требует проведения экспериментов с ДНК с различным GC- содержанием.

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. ДАН БССР, 24, 3, с.264-267, 1980.
2. Бабаян Ю.С. Конформация и термостабильность двуспиральных нуклеиновых кислот в водных растворах мочевины. Мол. биол., 22, 5, с.1204-1210, 1988.
3. Бабаян Ю.С., Маркарян А.Ш., Калантарян В.П., Казарян Р.С., Парсаданян М.А., Вардеванян П.О. Воздействие низкоэнергетического миллиметрового электромагнитного излучения на стабильность молекул ДНК в растворе. Биофизика, 52, 2, с.382-384, 2007.
4. Калантарян В.П., Акопян С.Н., Вардеванян П.О. Влияние слабых электромагнитных волн на тепловые свойства водных растворов биомакромолекул. Изв. НАН РА, Физика, 52, 2, с.1001-1005, 2018.
5. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашир В.А. Физические свойства системы ДНК-вода. Биофизика, 38, 5, с.768-790, 1993.
6. Петросян В.И., Силин Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В. Роль резонансных молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем. Биомед. Радиоэлектр., 5-6, с.62-144, 2001.
7. Шелкина А.К., Минченкова Л.Е., Иванов В.И. Влияние температуры на параметры двойной спирали ДНК в растворе. Мол. биол. 11, 2, с.466-472, 1977.
8. Aloyan L., Ko J., Kim B. G., Vardanyan I., Dalyan E., Chalikian T. Effect of urea on G-quadruplex stability. J. Phys. B., 121, p.6511-6519, 2017.
9. Carvalho C. I., Santos R.X., Cardoso S. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. Current Med. Chem., 16, 25, p.3267-3285, 2009.
10. Frank-Kamenetskii M.D. The simple empiric relationship between DNA melting temperature, its GC-content and $[Na^+]$ concentration in solution. Biopolymers, 10, p.278-279, 1971.
11. Ghazaryan R.S., Hakobyan S.N., Shahinyan M.A. Calculation of central moments of differential melting curve of DNA molecule. Proc. YSU, Phys.-Math. Sci, 51, 2, p.187-192, 2017.
12. Hall K.B., Maestre M.F. Temperature-dependent reversible transition of poly (dCdG) · poly (dCdG) in ethanolic and methanolic solutions. Biopolymers, 23, 11, p.2127-2139, 1984.
13. Kalantaryan V.P., Hakobyan S.N., Babayan Yu.S. Influence of millimeter wave electromagnetic radiation of nonthermal intensity on density of aqueous solutions. J. Contemporary Phys., 52, 11, p.58-62, 2017.
14. Kalantaryan V., Martirosyan, R., Babayan Yu., Nersesyan L., Stepanyan H. Preliminary results of influence of nonionizing electromagnetic radiation on tumor and healthy DNA and role of water. Amer. J. Med Biol. Res., 2, 1, p.18-25, 2014.
15. Lown J.W. Discovery and development of anthracycline antitumor antibiotics. Chem. Soc. Rev., 22, p.165-176, 1996.
16. Schneider B., Berman H.M. Hydration of the DNA bases is local. Biophys J., 69, p.2661-2669, 1995.

Поступила 06.09.2021