

УДК 577.113.6

П. О. Вардеванян, А. П. Антонян, Г. С. Саркисян, С. Г. Арутюнян

**Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК в
присутствии cis-DDP**

(Представлено чл.-кор. НАН РА Э.С. Геворкяном 6/VI 2008)

Ключевые слова: комплексы ДНК-cis-DDP-БЭ, температура плавления, ширина интервала плавления

Определение стабилизирующего или дестабилизирующего действия различных низкомолекулярных соединений на нативную (двухцепочечную) структуру ДНК имеет большое значение, поскольку ДНК может менять свою структуру и в некоторых случаях из двухцепочечного (дц) переходить в одноцепочечное (оц) состояние [1,2]. ДНК в клетке окружена различными молекулами и в процессе реализации биологических функций образует с этими соединениями различные комплексы [1-5]. Низкомолекулярные соединения с ДНК связываются ковалентным или нековалентным способами. Несмотря на различия в способах связывания лигандов, интегральный результат – стабилизация дц- или оц-структуры ДНК может быть схожа. В частности, ковалентно связывающееся соединение cis-дихлордиаминплатина (cis-DDP), являющееся также противоопухолевым препаратом, при низких концентрациях стабилизирует дц-структуру ДНК [6-10]. Аналогичное влияние имеет нековалентно связывающееся соединение бромистый этидий (БЭ) [5].

Известно, что при низких концентрациях cis-DDP образует ковалентные сшивки с гуаниновыми основаниями ДНК, удаленными друг от друга на несколько сот оснований вдоль макромолекулы, что может приводить к образованию псевдокольцевых структур в ДНК [11]. Возможно также образование сшивок между отдельными молекулами ДНК (межмолекулярные сшивки) [7,8]. Следствием этого является подавление репликации и транскрипции ДНК, чем и обусловлена цитотоксичность cis-DDP [11-13]. БЭ же при

низких концентрациях интеркалирует в плоскость между парами оснований ДНК, вследствие чего возникает дополнительное стэкинг-взаимодействие, что приводит к стабилизации дц-структуры. Этот лиганд является анти-бактериальным, а также мутагенным веществом (т.е. обладает определенной цитотоксичностью) [5].

Известные в настоящее время исследования относятся к отдельному взаимодействию того или иного лиганда с ДНК, в то время как совместное связывание различных соединений с ДНК практически мало изучено. С этой точки зрения определенный интерес представляет исследование совместного связывания *cis*-DDP и БЭ с ДНК. Целью данной работы явилось исследование плавления комплексов ДНК-*cis*-DDP-БЭ и определение параметров - температуры (T_m) и ширины интервала плавления (ΔT) двойных комплексов.

В работе были использованы ДНК тимуса теленка фирмы "Sigma" (США), БЭ, "Serva" (Германия), *cis*-DDP (Sigma Chem. Comp., США), NaCl, NaClO₄ (ос. ч). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК и БЭ были определены абсорбционным методом с использованием следующих коэффициентов экстинкции: для ДНК тимуса теленка — $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, для БЭ — $\epsilon_{480} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрацию *cis*-DDP получили методом взвешивания, с дальнейшим приготовлением концентрированного раствора. Соответствующие рабочие концентрации *cis*-DDP получили разбавлением исходного концентрированного раствора. Исследования проводились в буфере, содержащем 10^{-2} моль NaClO₄ + 10^{-3} моль NaCl, ионная сила составляла — $\mu = 0.01 \text{ M Na}^+$, pH 6.9.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре PYE Unicam-SP8-100 (Англия). Использовали кварцевые кюветы длиной оптического пути 1 см. Плавление ДНК и ДНК-*cis*-DDP-БЭ комплексов осуществлялось абсорбционным методом при длине волны $\lambda = 260 \text{ нм}$. Значения поглощений образцов выводились на дисплей компьютера с помощью программы, обработанной В. Элбакяном в среде программирования LabVIEW 7.0. При плавлении комплексов нагрев растворов, помещенных в термостатированные кюветы с герметически закрытыми тефлоновыми пробками, осуществлялся со скоростью 0.25 град/мин с помощью прибора SPX-876 Temperature Programme Controller (Англия). Температура растворов образцов менялась от 45 до 98°C. Параметры плавления комплексов — T_m и ΔT определялись, как описано в [3]. Размер точек соответствует среднему значению 5-6 измерений. Ошибка экспериментов составляла ~ 5%.

Исследования комплексов БЭ с ДНК в широком интервале изменения концентрации лиганда ($0 < r_b \leq 0.4$) выявили, что при значениях $r_b \leq 0.1$ ($r_b = \text{БЭ/ДНК}$) T_m и ΔT комплексов возрастают (рис. 1). При дальнейшем

увеличении концентрации БЭ T_m комплексов продолжает возрастать, в то время как ΔT , проходя через слабо выраженный максимум ($0.1 < r_b \leq 0.15$), уменьшается. При низких концентрациях основным способом связывания БЭ с ДНК является интеркаляция, что приводит к стабилизации дц-структуры ДНК и увеличению T_m . Возрастание же ΔT комплексов обусловлено тем, что в ходе плавления происходит перераспределение связанных молекул лиганда с расплавленных оц-участков на дц-участки ДНК. При увеличении концентрации БЭ перераспределение прекращается, вследствие чего ΔT комплексов выходит на плато и при более высоких концентрациях БЭ начинает уменьшаться. Этот феномен обусловлен тем, что БЭ с ДНК начинает связываться и другими способами [5,14].

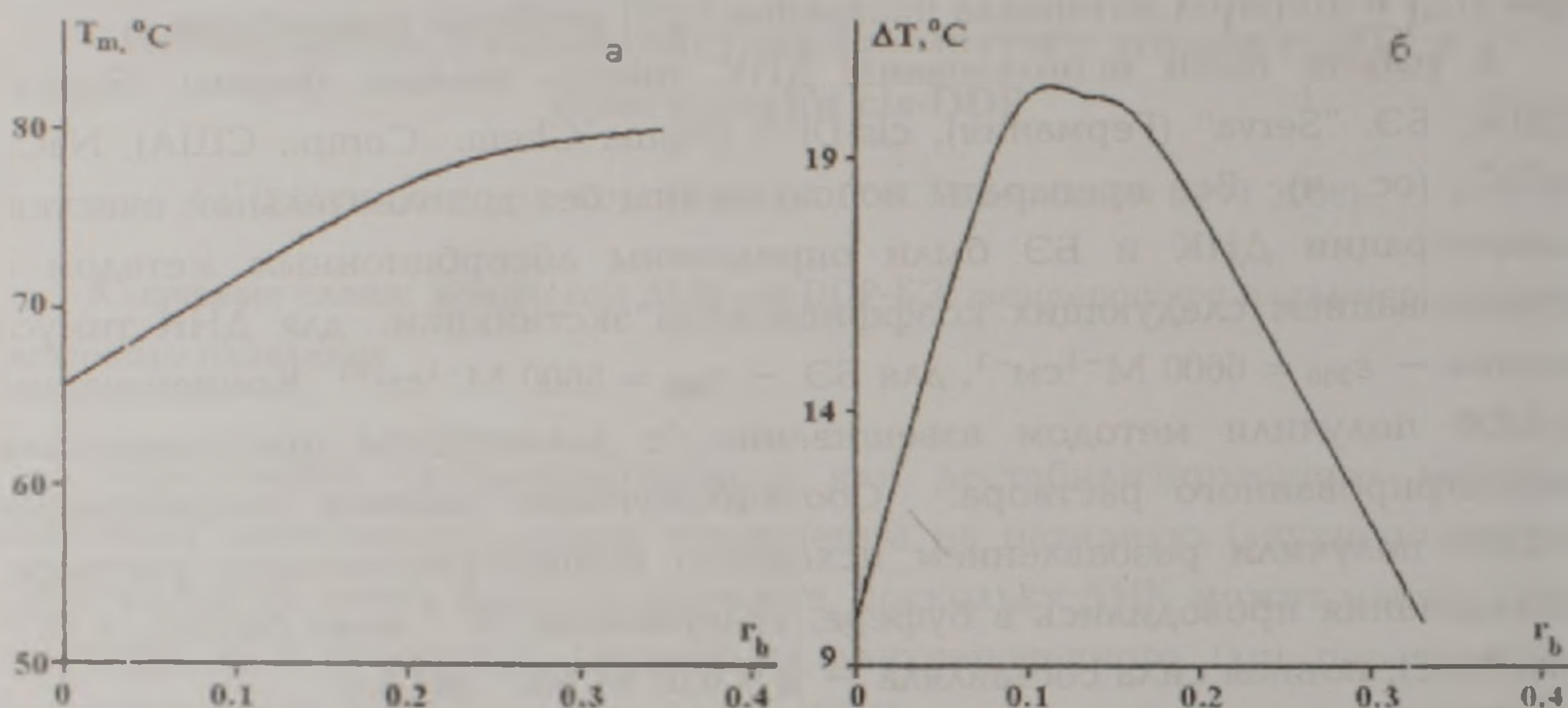


Рис. 1. Кривые зависимости T_m (а) и ΔT (б) от r_b комплексов БЭ-ДНК, где $r_b = \text{БЭ/ДНК} \cdot 10^{-2} \text{ М Na}^+$, pH=6,9.

При этом T_m комплексов уменьшается в результате двух противоположных эффектов: интеркалированные молекулы стабилизируют, а связанные другими способами (полуинтеркалированные, а также связанные с оц-участками ДНК) молекулы БЭ дестабилизируют дц-структуру ДНК. По достижении равновесия этих эффектов ΔT комплексов уменьшается, а возрастание T_m прекращается. При высоких концентрациях дестабилизирующий эффект БЭ на дц-ДНК превалирует, вследствие чего T_m комплексов уменьшается, а ΔT резко возрастает, поскольку начинается перераспределение связанных молекул БЭ с дц-участков ДНК на оц-участки.

При низких концентрациях T_m и ΔT комплексов cis-DDP — ДНК возрастают по сравнению с параметрами плавления чистой ДНК, как это видно на рис. 1, где представлены кривые зависимости T_m и ΔT от $-\lg(C)$. ($-\lg(C)$ — отрицательный логарифм отношения концентраций cis-DDP/ДНК в растворе [11]). В рамках существующих теорий объяснить

это явление невозможно. Было высказано предположение о возможности образования псевдокольцевых структур в ДНК, что в дальнейшем получило обоснование в работе [12]. На основании данных, полученных для комплексов ДНК с *cis*-DDP в широком интервале изменения концентрации последнего, было выявлено, что механизмы взаимодействия этого препарата с ДНК различны, что отражается на T_m и ΔT комплексов следующим образом (рис. 2, а, б, сплошные линии): 1) в интервале изменения концентрационного соотношения $10^{-9} \leq C \leq 10^{-8}$ (где $C = \text{cis-DDP}/\text{ДНК}$) T_m и ΔT комплексов значительно увеличиваются по сравнению с T_0 и ΔT_0 чистой ДНК. В этом интервале изменения r_b в молекуле ДНК образуются кольцевые структуры; 2) в интервале изменения $10^{-8} \leq C \leq 10^{-5}$ T_m и ΔT комплексов монотонно уменьшаются, поскольку увеличение числа кольцевых структур приводит к разрыву водородных связей и облегчению плавления комплексов.

В интервале $C > 10^{-5}$ T_m комплексов резко уменьшается, а ΔT увеличивается в результате образования оц- и дц-цепочечных (дц-) разрывов в ДНК с последующим формированием коротких линейных фрагментов ДНК.

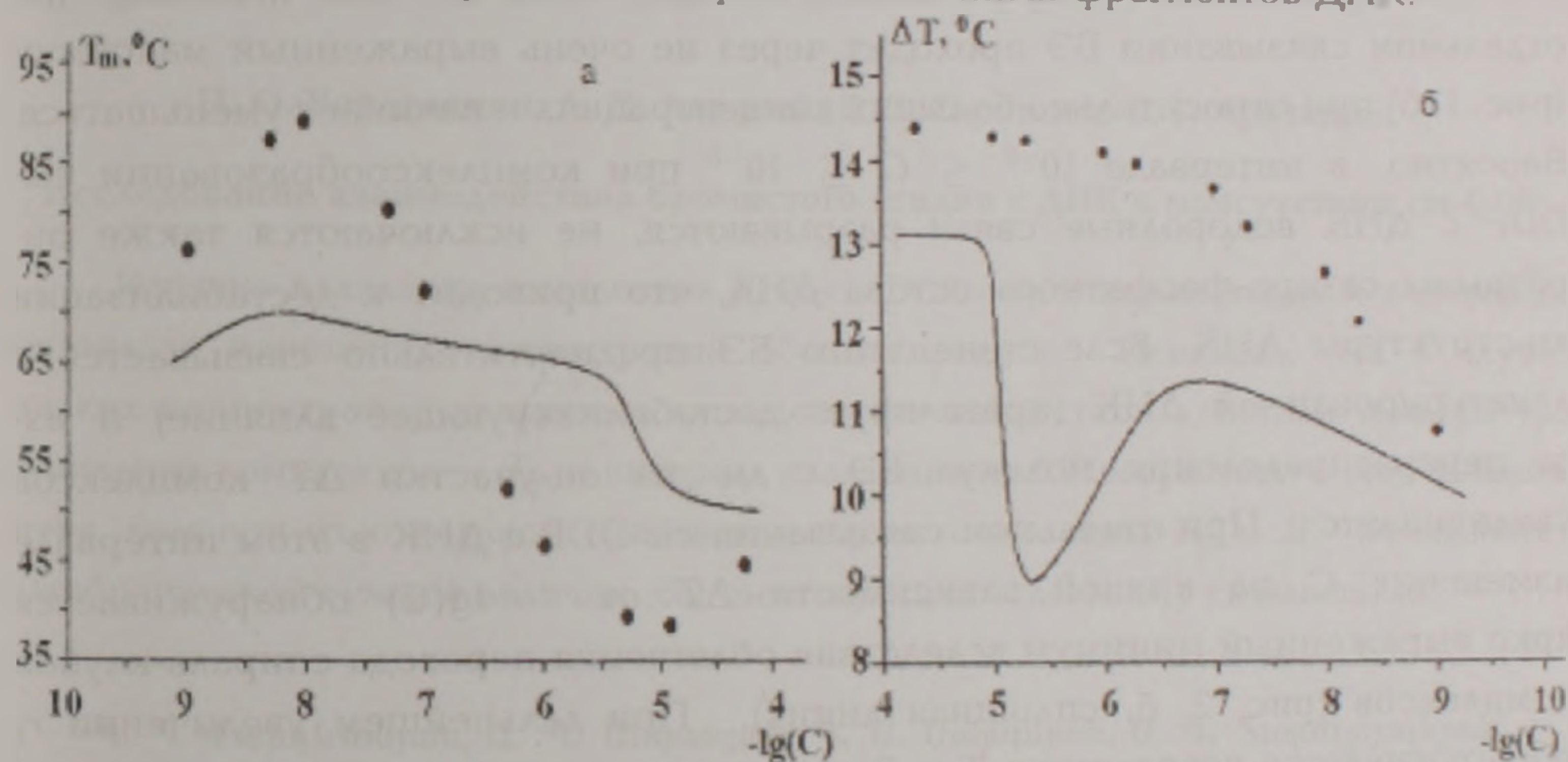


Рис. 2. Кривые зависимости T_m (а) и ΔT (б) от $-\lg(C)$ комплексов БЭ с *cis*-DDP — ДНК. Сплошная линия соответствует зависимостям T_m и ΔT от $-\lg(C)$ комплексов *cis*-DDP — ДНК в интервале изменения $C - 10^{-9} \leq C \leq 10^{-5}$. Точки соответствуют комплексам БЭ с *cis*-DDP — ДНК в интервале изменения $0 \leq r_b \leq 0.4$. Ионная сила раствора 10^{-2} М Na^+ , pH=6.9.

На рис. 2 приведены также зависимости T_m (а) и ΔT (б) от $-\lg(C)$ ($C = \text{cis-DDP}/\text{ДНК}$) (точки на соответствующих кривых) при комплексообразовании *cis*-DDP-ДНК с БЭ. Концентрационное соотношение БЭ/ДНК менялось в интервале $0 \leq r_b \leq 0.4$. При совместном взаимодействии при низких концентрациях как *cis*-DDP, так и БЭ T_m и ΔT комплексов увеличиваются

намного больше, чем при отдельном связывании, хотя эффект усиления не является простой суммой воздействия этих веществ в отдельности на ДНК. Необходимо отметить, что данные, полученные при комплексообразовании БЭ с *cis*-DDP — ДНК практически не отличались от аналогичных данных, полученных в случае, когда БЭ — ДНК комплексы инкубировались в присутствии *cis*-DDP в течение 48 ч. Это обусловлено тем, что *cis*-DDP ковалентно связывается с ДНК и при инкубации связанные молекулы БЭ практически не препятствуют специфическому связыванию молекул *cis*-DDP с ДНК.

Как видно из рис. 2, при увеличении r_b T_m комплексов начинает уменьшаться в интервале изменения $C - 10^{-8} \leq C \leq 10^{-5}$, при этом понижение T_m тройной системы ДНК — *cis*-DDP — БЭ намного больше, чем в случае отдельных взаимодействий этих лигандов. Это указывает на то, что под влиянием *cis*-DDP дестабилизирующее влияние БЭ на дц-ДНК усиливается. На это указывает и тот факт, что ΔT тройной системы продолжает увеличиваться, несмотря на то, что этот параметр при отдельном связывании БЭ проходит через не очень выраженный максимум (рис. 1, б) при относительно больших концентрациях и начинает уменьшаться. Вероятно, в интервале $10^{-8} \leq C \leq 10^{-5}$ при комплексообразовании *cis*-DDP с ДНК водородные связи разрываются, не исключаются также оц-разрывы сахаро-фосфатного остова ДНК, что приводит к дестабилизации дц-структуры ДНК. Вследствие этого БЭ предпочтительно связывается с денатурированной ДНК (превалирует дестабилизирующее влияние) и из-за перераспределения молекул БЭ с дц- на оц-участки ΔT комплексов увеличивается. При отдельном связывании *cis*-DDP с ДНК в этом интервале изменения C на кривой зависимости ΔT от $-\lg(C)$ обнаруживается ярко выраженный минимум вследствие облегчения перехода спираль-клубок комплексов (рис. 2, б, сплошная линия). При дальнейшем увеличении r_b обнаруживается возрастание T_m . В этом интервале изменения соотношения *cis*-DDP/ДНК образуются короткие линейные фрагменты, вследствие чего T_m комплексов при отдельном взаимодействии *cis*-DDP с ДНК уменьшается. Поскольку при этом дц-структура фрагментов ДНК восстанавливается, то молекулы БЭ начинают интеркалировать в эти структуры, что приводит к стабилизации дц-ДНК и возрастанию T_m тройной системы *cis*-DDP — ДНК — БЭ. В этих условиях ΔT также увеличивается из-за возрастания GC-гетерогенности указанных фрагментов, однако этот эффект выражен не ярко.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить:

- при низких концентрациях *cis*-DDP и БЭ параметры плавления ДНК меняются в одном и том же направлении, при этом наблюдается взаимное

усиление стабилизирующего влияния этих соединений на дц-структуру ДНК,

- при относительно высоких значениях t_b наблюдается противоположное влияние этих соединений на T_m и ΔT тройной системы при переходе с спираль — клубок ДНК,
- несмотря на то, что cis-DDP образует с ДНК необратимые ковалентные связи, обратимо связывающееся соединение БЭ определенным образом влияет на структуру комплексов cis-DDP — ДНК,
- в определенных условиях эти соединения могут иметь синергетическое, а в других — антагонистическое влияние при совместном взаимодействии с ДНК.

Ереванский государственный университет

П. О. Вардеванян, А. П. Антонян, Г. С. Саркисян, С. Г. Арутюнян

Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК в присутствии cis-DDP

Изучено плавление комплексов ДНК-cis-DDP с бромистым этидием в широком интервале изменения концентраций обоих лигандов. Показано, что в случае низких концентраций указанных лигандов и их совместном действии температура плавления комплексов — T_m и интервал плавления — ΔT возрастают в еще большей мере, чем при их отдельном связывании, причем величины T_m и ΔT не являются алгебраической суммой величин, соответствующих отдельному связыванию.

Պ. Ն. Վարդևանյան, Ա. Պ. Անտոնյան, Գ. Ս. Սարգսյան, Ս. Գ. Նարուժուհյան

ԴՆԹ-ի հետ բրոմական էթիդիումի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը cis-ԴԴՊ-ի առկայությամբ

Ուսումնասիրվել է ԴՆԹ — cis-ԴԴՊ-ի հետ բրոմական էթիդիումի կոմպլեքսների հալումը երկու լիգանդների կոնցենտրացիաների փոփոխության լայն միջակայքում: Ցույց է փրվել, որ նշված լիգանդների ցածր կոնցենտրացիաների եւ համադրել փոխազդեցության դեպքում կոմպլեքսների հալման ջերմաստիճանը T_m -ը, եւ հալման միջակայքը ΔT -ն, ավելի մեծ չափով են աճում, քան նրանց առանձին կապման դեպքում, ընդ որում, T_m -ի եւ ΔT -ի արժեքները չեն ներկայացնում առանձին կապման դեպքում ստացված համապատասխան մեծությունների հանրահաշվական գումար:

Study of Ethidium Bromide Interaction with DNA in the Presence of cis-DDP

The melting of Ethidium Bromide with DNA-cis-DDP complexes in a wide interval of change both ligands is carried out. It is revealed, that at the low concentration of both ligands at joint binding with DNA the melting temperature (T_m) and width of melting interval (ΔT) of complexes are increased much more, than at separate binding, however, sizes of T_m as well as ΔT are not the algebraic sum of the appropriate values at separate binding.

Литература

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. - Биофизика. 2003. Т. 48. N 4. С. 644-647.
2. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. - Мол. биол. 1997. Т. 31. N2. С. 263-273.
3. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. - Мол. биол. 2000. Т. 34. N2. С. 310-315.
4. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суровая А.Н. - Мол. биол. 1998. Т. 32. С. 855-862.
5. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. - Exp. and Mol. Medicine. 2003. V. 35. N6. P. 527-533.
6. Bongard N., Reedyk J. - J. Inorg. Biochem. 1991. V. 43. P. 428.
7. Eastman A. - Biochemistry. 1985. V. 24. P. 5027.
8. Cicarelli R.B., Solomon H.J., Varshavsky A., Lippard S.J. - Biochemistry. 1985. V. 24. P. 7533.
9. Inagaki K., Kindani Y. - Inorg. Chem. Acta, 1985. V. 106. P. 187.
10. Millar O.P., Ho K.M., Aroney H.Y. - Biochemistry. 1988. V. 27. P. 8599.
11. Арутюнян С.Г., Мамасакхисов Е.Ш., Морозов В.Ф., Далян Е.В., Хачикян Р.Э., Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Ориоли П., Бруни Б. - Биофизика. 1997. Т. 42. Вып. 2. С. 372.
12. Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Morozov V.F., Mamasachlissov Eu.Sh., Shahinian M.S., Akhrem A.A., Lando D.Yu., Messori L., Orioli P. - Inorg. Chimica Acta. 1998. V. 275-276, P. 510.
13. Coluccia M., Boccarelli A., Cermelli C., Portolani M., Natile G. - Metal-Based Drugs. 1995. V. 2. N5. P. 249 - 256.
14. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. - Exp. and Mol. Medicine. 2001. V. 33. N4. P. 205-208.