

Спектрофотометрическое исследование механизмов связывания аналогов цитидина и бромистого этидия с ДНК

Е. Л. Ермак^{1,2}, Е. Б. Круглова², Л. И. Пальчиковская³, И. В. Алексеева³

¹Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина

²Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины
Ул. Академика Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина

e_ermak@ire.kharkov.ua

Для выяснения механизмов связывания цитидина и его биологически активных производных с ДНК исследовано их взаимодействие с ДНК в присутствии интеркалятора бромистого этидия (ЭБ). Проведен спектрофотометрический анализ электронных спектров поглощения смесей ЭБ–ДНК в присутствии цитидина и его аналогов в широкой области длин волн и концентраций ДНК. Аналоги цитидина, содержащие дополнительный атом азота в гетероцикле (6AZC, AZAfur и AZAxyl), конкурируют с ЭБ за места связывания на ДНК. Константы ассоциации и параметры мест связывания образующихся комплексов для этих производных рассчитаны с помощью программ оптимизации спектров поглощения смесей ЭБ–ДНК–нуклеозид COMP и DALSMOD. Немодифицированные по цитозинового кольца нуклеозиды (цитидин и Ara-C) не являются конкурентами ЭБ за места связывания на ДНК, однако в их присутствии изменяются концентрационные зависимости кривых титрования ЭБ в области низких концентраций ДНК. Это можно объяснить влиянием упомянутых нуклеозидов на структурные или конформационные изменения матрицы ДНК в присутствии ЭБ в области низких значений $P/D_{ЭБ}$, где $P/D_{ЭБ}$ – отношение общих концентраций ДНК и ЭБ.

Ключевые слова: аналоги цитидина, ДНК, модели связывания, спектрофотометрия, бромистый этидий.

Введение. Биологически активные нуклеозиды цитозинового ряда взаимодействуют с ДНК и влияют на ее функционирование в клетке. Многие представители этой группы веществ являются лекарственными препаратами генонаправленного действия и широко используются в противоопухолевой терапии при лечении лейкемии и других заболеваний [1–5]. Взаимодействие терапевтически активных

нуклеозидов с ДНК в клетке приводит к замедлению синтеза нуклеиновых кислот (НК) и апоптозу [6].

Клинический противолейкозный агент цитозин-арабинозид (Ara-C), гликозидный аналог цитидина, достаточно легко и быстро метаболизируется в клетке. Известно, что Ara-C-трифосфат встраивается в ДНК, изменяя ее структурное и конформационное состояние, что в дальнейшем приводит к нарушению функционирования белково-нуклеиновых комплексов [7, 8]. Еще один аналог цитидина

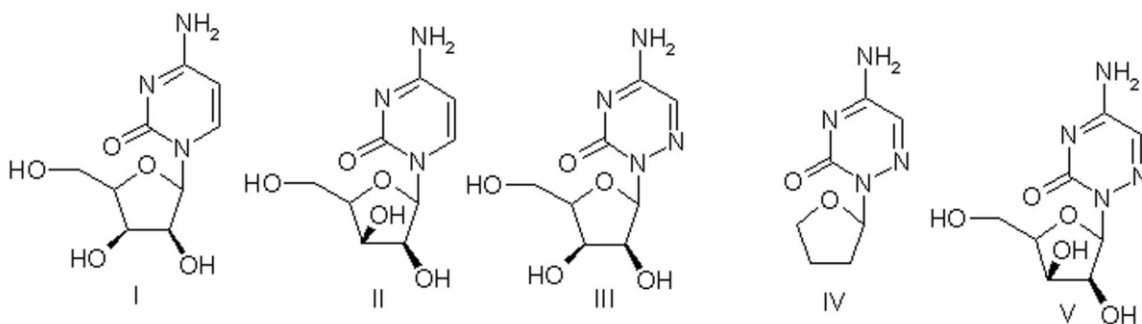


Рис. 1. Химические формулы цитидина (Cyd) (I); цитозин-арабинозида (Ara-C) (II); 6-азацитозин-рибофуранозида (6AZC) (III); 6-азацитозин-тетрагидрофурила (AZAfur) (IV); 6-азацитозин-ксилофуранозида (AZAxyl) (V)

(Cyd), его биоизомер 6-азацитидин (6AZC) тоже обладает широким спектром противоопухолевой и противовирусной активности [9–12]. В отличие от Ага-С четкие данные о механизме биологического действия 6AZC пока отсутствуют. В литературе описаны результаты лишь опосредованного влияния 6AZC на подавление репродукции вирусов, что выражается в снижении синтеза вирусной ДНК и вирусных полипептидов [9, 10]. Аналогично происходит и ингибирование опухолевого роста, которое тоже связывают с торможением системы синтеза макромолекул [11, 12].

Таким образом, открытыми остаются вопросы о непосредственном вмешательстве 6AZC в биосинтез НК как препарата нуклеозидной природы и о его взаимодействии с ДНК. Наряду со встраиванием в молекулу ДНК при помощи ферментов клетки возможно непосредственное взаимодействие этих малых молекул (лигандов) с ДНК за счет либо внешнего связывания в бороздке, либо интеркаляции. Однако молекулярные механизмы комплексообразования каждого из рассмотренных нуклеозидов с ДНК остаются недостаточно изученными. В связи с этим представляет интерес более детальное исследование связывания аналогов цитидина с ДНК, используя новые теоретические (моделирование процессов) и экспериментальные (конкурентное связывание) подходы.

Одним из информативных методов изучения взаимодействия лигандов с ДНК является спектрофотометрический метод, позволяющий не только фиксировать наличие связи ДНК–лиганд, но и, применяя современные модельные подходы [13, 14],

охарактеризовать возможные механизмы такого взаимодействия.

Поскольку электронные спектры поглощения нуклеозидов лежат в той же области длин волн, что и спектры поглощения НК, для исследования их взаимодействия с ДНК мы использовали методику конкурентного связывания с ДНК в присутствии окрашенной метки. В качестве метки-лиганда, поглощающего в видимой области спектра, выбран бромистый этидий (ЭБ).

Материалы и методы. В работе использовали коммерческую ДНК из тимуса теленка фирмы «Serva» (ФРГ) и бромистый этидий фирмы «Fluka» (Швейцария). Цитидин (Cyd) и его аналоги (цитозин-арабинозид (Ara-C), 6-азацитозин-рибофуранозид (6AZC), 6-азацитозин-тетрагидрофурил (AZAfur), 6-азацитозин-ксилофуранозид (AZAxyl) синтезированы в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины, их использовали без дополнительной очистки. Концентрации нуклеозидов определяли весовым методом.

Химические формулы исследуемых нуклеозидов приведены на рис. 1.

При определении концентрации тимусной ДНК (C_p , моль фосфатов) и ЭБ использовали значения молярных коэффициентов экстинкции в максимуме поглощения ДНК $\epsilon_{260} = 6,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15] и ЭБ $\epsilon_{480} = 5,85 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [16]. Величины $R/D_{\text{ЭБ}}$ рассчитывали как отношение общей концентрации ДНК (C_p) к концентрации ЭБ (C_D). Спектрофотометрические измерения в видимой и УФ областях проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 и 20 мм на спектрофотометре Specord M40

(ФРГ) в фосфатном ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \cdot 10^{-2}$ М Na_2HPO_4) буферном растворе с рН 6,86.

Наши исследования показали, что в присутствии анализируемых нуклеозидов и в отсутствие ДНК спектр поглощения ЭБ не меняется (данные не приведены), что свидетельствует об отсутствии гетероассоциации между ЭБ и нуклеозидами.

Параметры связывания рассмотренных нуклеозидов с ДНК (константы, величины мест связывания и молярные коэффициенты экстинкции образующихся комплексов) рассчитывали по двум различным моделям.

Модель 1 отражает связывание нуклеозида (лиганд₁) и ЭБ (лиганд₂) с ДНК с учетом образования только одного типа комплексов на ДНК для каждого из них. Величины мест связывания нуклеозида (n_1) и ЭБ (n_2) варьируют в широкой области значений. Для расчета равновесных концентраций свободных и связанных с ДНК нуклеозида и ЭБ в каждой смеси ЭБ–ДНК–нуклеозид в этом случае использовали систему уравнений (1)–(4):

$$\frac{R_1}{m_1} K_1 \left[\frac{1}{1 + \frac{R_1 n_1}{R_1 n_1} + \frac{R_2 n_2}{R_2 n_2} + R} \right]^{n_1} (1 + R_1 n_1 + R_2 n_2 + R); \quad (1)$$

$$\frac{R_2}{m_2} K_2 \left[\frac{1}{1 + \frac{R_1 n_1}{R_1 n_1} + \frac{R_2 n_2}{R_2 n_2} + R} \right]^{n_2} (1 + R_1 n_1 + R_2 n_2 + R); \quad (2)$$

$$C_{D1} = m_1 R_1 C_p; \quad (3)$$

$$C_{D2} = m_2 R_2 C_p. \quad (4)$$

Уравнения (1) и (2) описывают конкурентное связывание двух лигандов с основаниями ДНК [17]; уравнения (3) и (4) – закон сохранения общих концентраций (C_{D1} , C_{D2}) для лиганда 1 и лиганда 2 соответственно. В уравнениях (1)–(4) использованы следующие обозначения: m_1 и m_2 – равновесные концентрации свободных лигандов; R_1 и R_2 – относительные концентрации связанных лигандов 1 и 2, определяемые в каждой смеси как частное от деления концентраций связанных лигандов к общей концентрации ДНК (C_{D1}). K_1 , K_2 – константы связывания

каждого из лигандов со своим местом связывания, характеризующимся размером n_1 и n_2 нуклеотидов; R обозначает сумму ($R_1 + R_2$).

Модель 2 представляет связывание нуклеозидов с ДНК в предположении, что величина их места связывания на ДНК $n_1 = 1$, т. е. один нуклеозид связан с одним фосфатом. Для ЭБ рассматривается возможность его кооперативного связывания с ДНК с фактором кооперативности α . Такая модель позволяет учитывать возможные изменения в спектре связанного ЭБ при его размещении рядом с уже занятыми местами связывания, что возможно в области низких концентраций ДНК при более плотном заполнении матрицы НК лигандами. Для расчета равновесного состава смесей ЭБ–ДНК–нуклеозид в этом случае используют систему уравнений, аналогичную приведенной выше, но вместо уравнения (2) подставляют уравнение МакГи, фон Хиппела [18] для кооперативного связывания лиганда, детально описанную нами в [19]. Концентрацию связанного с ДНК ЭБ ($R_1 - C_p$) в каждой смеси мы разделили на две: концентрацию лиганда, не имеющего соседей ($C_{m.b.} = (R_1 - C_p)^2 / R_1 C_D$ [17]), и концентрацию молекул ЭБ, расположенных на соседних местах связывания. Такое разделение концентраций связанного ЭБ позволяет в дальнейшем определить молярные коэффициенты экстинкции мономерно связанных и агрегированных лигандов в отдельности.

Равновесный состав смесей и оптимальные значения параметров связывания образующихся комплексов для *Модели 1* рассчитывали с использованием новой программы оптимизации COMP [20], а для *Модели 2* – программы DALSMOD [21, 22]. Эти две компьютерные программы составлены на основе оригинальной программы оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей DALС, предложенной ранее Хартли и др. [23], за счет изменений в алгоритме процедуры расчета равновесных концентраций смесей в приближении взаимодействия лигандов с полиэлектролитными матрицами. В программе оптимизации COMP, описывающей конкурентное связывание двух лигандов с ДНК, при составлении алгоритма расчета равновесных концентраций смесей использовали уравнения (1)–(4) для разных по величине значений n_1 , n_2

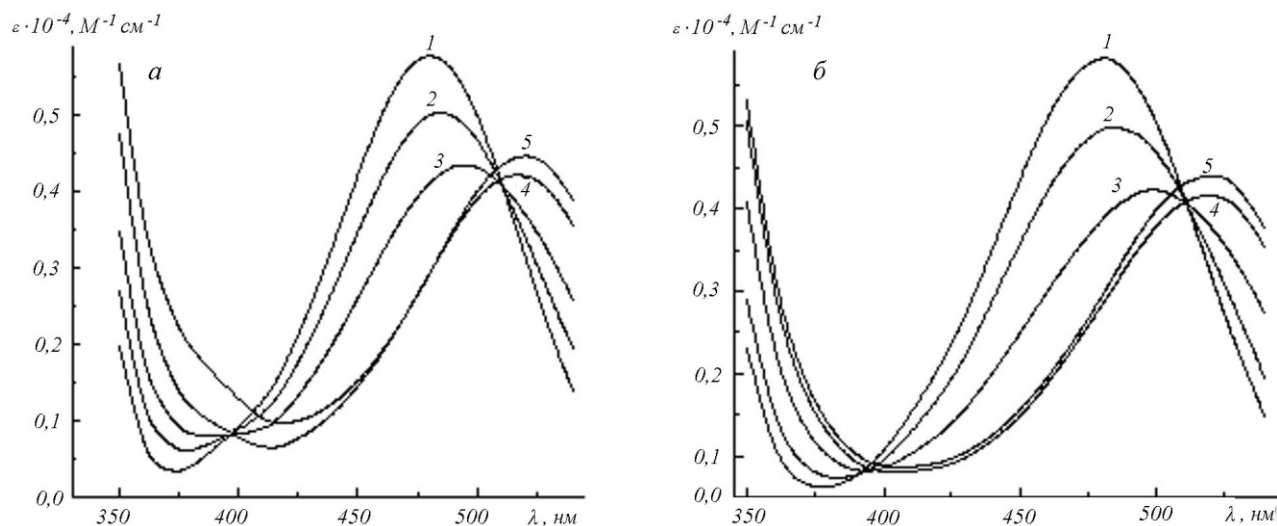


Рис. 2. Спектры поглощения смесей ЭБ–ДНК при $C_{ЭБ} = 1,145 \cdot 10^{-4}$ М; P/D = 0 (1); 1,0 (2); 2,0 (3); 5,0 (4); 21,7 (5) (а) и смесей ЭБ–ДНК–6АЗС при $C_{ЭБ} = 9,865 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{6АЗС} = 1,124 \cdot 10^{-4}$ М; P/D = 0 (1); 1,1 (2); 2,7 (3); 7,3 (4); 13,4 (5) (б)

[19]. Программа оптимизации DALSMOD детально представлена в работах [20, 21]. С помощью этих программ оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции образующихся комплексов (ϵ_{ij}) и констант связывания лигандов при формировании каждого типа комплексов вычисляли, минимизируя суммы квадратов отклонений наблюдаемых поглощений смесей A_{ij}^0 от расчетных значений A_{ij} , рассчитанных одновременно для всех смесей в широком интервале длин волн.

Расчетные значения A_{ij} получали по уравнению Бугера-Ламберта-Бера:

$$A_{ij} = \sum_k \epsilon_{jk} l C_{ki},$$

где ϵ_{jk} – молярный коэффициент экстинкции k -й компоненты смеси при j -й длине волны, а C_{ki} – концентрация соответствующего компонента в каждой i -й смеси.

Выход из программ оптимизации с найденными оптимальными значениями ϵ_{jk} и константами связывания для каждой модели осуществляли, когда дальнейшие итерации по оптимизируемым параметрам K_i и ϵ_{ij} уже не приводили к уменьшению значения суммы квадратов отклонений. При выходе из программы оптимизации рассчитывали значе-

ния факторов Гамильтона Q и Q_{lim} [23] по уравнениям (5), (6):

$$Q = \left\{ \left(\frac{A_{ij}^0 - A_{ij}}{A_{ij}^0} \right)^2 \right\}^{1/2}; \quad (5)$$

$$Q_{\text{lim}} = \left\{ \left(\frac{e_{ij}^2}{A_{ij}^0} \right) \right\}^{1/2}, \quad (6)$$

где e_{ij} – отклонение в поглощении i -й смеси в каждой длине волны с учетом 1 % ошибки в приготовлении общих концентраций реагирующих компонентов и 0,005 опт. ед. в измерении поглощения. Величины Q и Q_{lim} характеризуют соответствие рассматриваемой модели экспериментальным данным с учетом величин ошибок в измерении поглощений смесей. Рассматриваемая модель (и соответствующие ей величины n_1 , n_2 и ϵ_{ij}) удовлетворительно описывает концентрационные спектральные изменения в смесях, когда $Q < Q_{\text{lim}}$.

Результаты и обсуждение. На рис. 2, а, приведены спектры поглощения смесей ЭБ–ДНК в широкой области концентраций ДНК ($(0 - 2,5) \cdot 10^{-3}$ М). Видно, что не все спектры из рассмотренной области значений P/D_{ЭБ} проходят через изобестические точки ($\lambda = 390$ нм и $\lambda = 510$ нм). Это свидетельствует об образовании в рассматриваемой системе как минимум двух разных типов комплексов, что под-

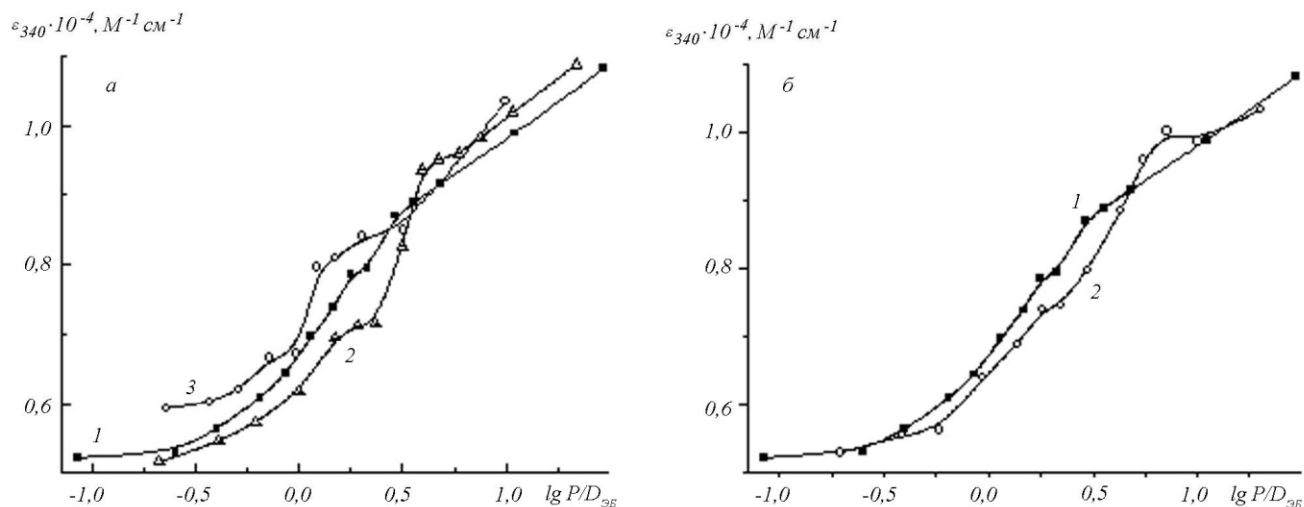


Рис. 3. Зависимость поглощения смесей ЭБ–ДНК ($C_{ЭБ} = 1,145 \cdot 10^{-4}$ М) (1, а, б), ($C_{ЭБ} = 1,136 \cdot 10^{-4}$ М, 0,12 М NaCl) (3, а) и ЭБ–ДНК–Ага-С ($C_{ЭБ} = 4,7 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{Ага-С} = 4,48 \cdot 10^{-4}$ М) (2) (а) и смесей ЭБ–ДНК–Суд ($C_{ЭБ} = 4,9 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Суд} = 1,3 \cdot 10^{-4}$ М) (2) (б) от $P/D_{ЭБ}$ при $\lambda = 340$ нм

тверждается и другими авторами [24–26]. В области низких значений $P/D_{ЭБ}$ (при плотной упаковке связанного на полинуклеотидной матрице ЭБ), как следует из ряда работ [27–31], может также происходить конформационный В → А переход молекул ДНК. Спектры поглощения ЭБ, связанного с ДНК в другой конформации, могут отличаться от таких же при его связывании с В-формой ДНК по типу интеркаляции. Таким образом, связываясь с ДНК, ЭБ способен образовывать комплексы как по типу классической интеркаляции (следуя модели исключения ближайшего соседа), так и по типу внешнего связывания при более плотном размещении его на матрице НК в области низких концентраций ДНК. Спектры этих комплексов различны и поэтому изобестические точки не сохраняются в широкой области рассмотренных концентраций ДНК, а кривые титрования смесей ЭБ–ДНК при разных длинах волн могут иметь особенности, проявляющиеся, например, в виде более или менее ярко выраженных ступеней, как это видно из данных рис. 3, а (кривые 1 и 3).

Рассмотрим теперь, как цитидин и его аналоги влияют на связывание ЭБ с ДНК. При добавлении в систему ЭБ–ДНК биологически активных нуклеозидов спектры смесей ЭБ–ДНК меняются. Эти изменения невелики (рис. 2, б) и значительно лучше

видны при сравнении кривых титрования смесей ЭБ–ДНК в отсутствие и в присутствии конкурирующих нуклеозидов (рис. 3–5).

Из анализа кривых титрования смесей ЭБ–ДНК и ЭБ–ДНК–нуклеозид при $\lambda = 340$ нм и $\lambda = 480$ нм видно, что при $\lambda = 340$ нм различия в спектрах поглощения этих смесей значительно больше по величине, чем в максимуме полосы поглощения ЭБ $\lambda = 480$ нм. Это дает возможность сравнить приведенные кривые титрования смесей ЭБ–ДНК в отсутствие и в присутствии нуклеозидов. Сопоставляя между собой кривые титрования для цитидина и его аналогов, можно заключить, что величина и характер изменений в кривой титрования смесей ЭБ–ДНК также различны. Так, в присутствии немодифицированных по цитозинового кольцу нуклеозидов (Суд и Ага-С) (рис. 3) немонотонность кривой титрования смесей ЭБ–ДНК–нуклеозид становится более ярко выраженной. Однако при больших значениях $P/D_{ЭБ}$ различия в кривых титрования смесей ЭБ–ДНК в отсутствие и в присутствии Суд и Ага-С уменьшаются.

Можно предположить, что эти нуклеозиды не являются непосредственными конкурентами за места связывания ЭБ с ДНК по типу классической интеркаляции, но влияют на процесс его связывания, например, изменяя гидратное окружение моле-

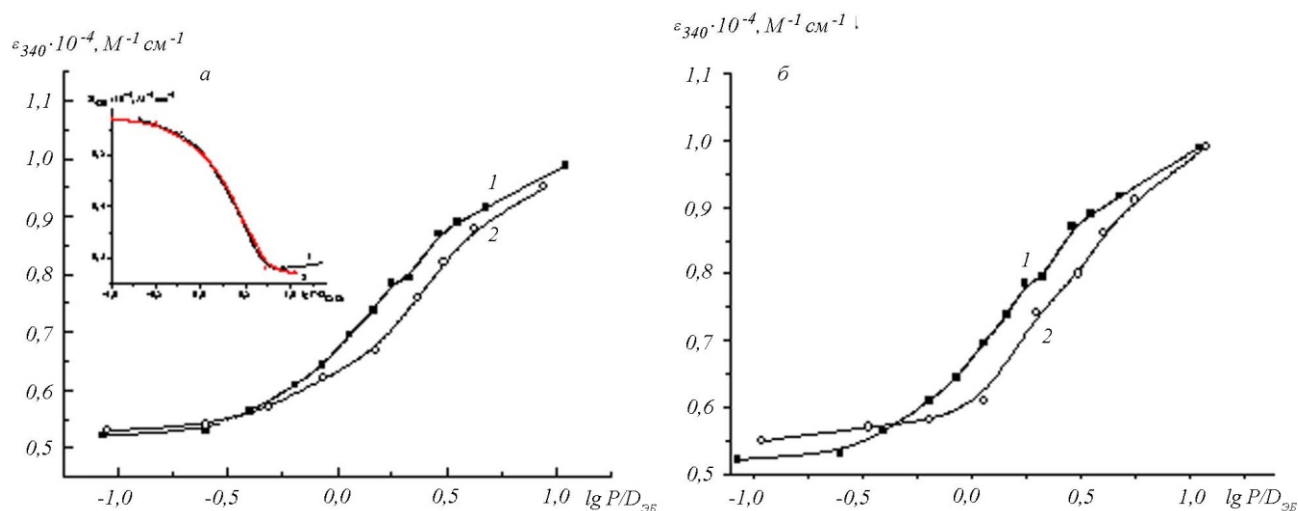


Рис. 4. Зависимость поглощения смесей ЭБ–ДНК ($C_{ЭБ} = 1,145 \cdot 10^{-4}$ М) (1 а, б) и ЭБ–ДНК–AZAfur ($C_{ЭБ} = 7,77 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{AZAfur} = 3,01 \cdot 10^{-5}$ М) (2) (а) и смесей ЭБ–ДНК–6AZC ($C_{ЭБ} = 7,54 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{6AZC} = 6,92 \cdot 10^{-4}$ М) (2) (б) от $P/D_{ЭБ}$ при $\lambda = 340$ нм. На вставке рис. 4, а: зависимость поглощения смесей ЭБ–ДНК ($C_{ЭБ} = 1,145 \cdot 10^{-4}$ М) (1) и ЭБ–ДНК–AZAfur ($C_{ЭБ} = 7,77 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{AZAfur} = 3,01 \cdot 10^{-5}$ М) (2) от $P/D_{ЭБ}$ при $\lambda = 480$ нм

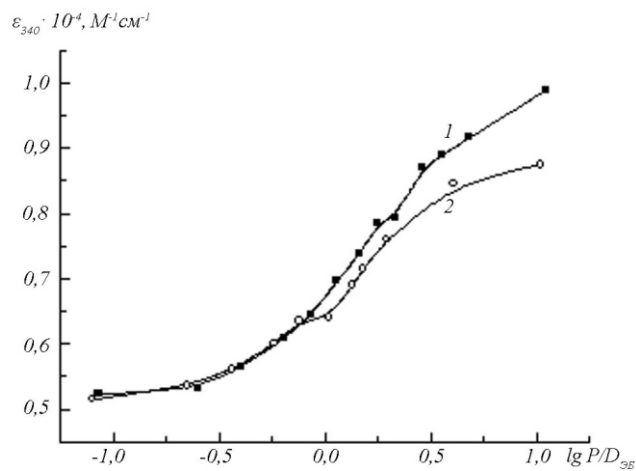


Рис. 5. Зависимость поглощения смесей ЭБ–ДНК ($C_{ЭБ} = 1,145 \cdot 10^{-4}$ М) (1) и ЭБ–ДНК–AZAхyl ($C_{ЭБ} = 1,28 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{AZAхyl} = 3,51 \cdot 10^{-4}$ М) (2) от $P/D_{ЭБ}$ при $\lambda = 340$ нм

кулы ДНК и поддерживая ее в А-подобной конформации. Поскольку ни одна из рассматриваемых моделей комплексообразования (*Модель 1*, *Модель 2*) не учитывает конформационных изменений матрицы (мест связывания) с ростом степени заполнения ее бромистым этидием, мы не можем с помощью

приведенных выше моделей рассчитать параметры связывания Суд и Ага-С с ДНК.

С другой стороны, вероятно, что влияние этих лигандов на связывание ЭБ с ДНК происходит, например, за счет их взаимодействия с теми группами оснований ДНК, которые не участвуют в образовании комплексов ЭБ с ДНК. В этом случае могут возникать стерические препятствия для связывания ЭБ с ДНК и эти нуклеозиды являются конкурентами ЭБ по внешнему типу связывания.

Как видно из рис. 4, а, б, и 5, модифицированные нуклеозиды (6AZC, AZAfur и AZAхyl), имеющие дополнительную азагруппу в цитозиновом кольце, по-другому влияют на характер связывания ЭБ с ДНК, являясь конкурентами ЭБ за места связывания на ДНК по второму типу комплексов (классическая интеркаляция). В таком случае изменения в кривых титрования смесей, незначительные в области низких значений $P/D_{ЭБ}$, увеличиваются с ростом концентрации ДНК. Также в присутствии этих лигандов кривые титрования смесей ЭБ–ДНК становятся более монотонными, т. е. 6AZC, AZAfur и AZAхyl связываются с В-конформацией ДНК и конкурируют с ЭБ за места связывания. Для этих лигандов нами рассчитаны парамет-

Оптимальные значения параметров связывания нуклеозидов 6AZC, AZAfur и AZAxyl с ДНК, рассчитанные по Модели 1 (программа оптимизации COMP) и Модели 2 (программа оптимизации DALSMOD)

Пара метр	6AZC	AZAfur	AZAxyl
<i>Модель 1</i>			
K_1, M^{-1}	(1,4 0,5) 10^4	(2,5 0,3) 10^4	(9,5 0,5) 10^{24}
n_1	1,1 0,1	1,2 0,1	1,1 0,1
n_2	2,9 0,1	3,0 0,4	2,5 0,1
Q	0,027	0,024	0,018
Q_{lim}	0,031	0,035	0,030
<i>Модель 2</i>			
K_1, M^{-1}	(1,3 0,3) 10^4	(8,3 1,3) 10^3	(8,7 1,5) 10^2
n_1	1,0	1,0	1,0
n_{21}	2,8 0,1	2,9 0,1	2,9 0,1
Q	0,027	0,023	0,013
Q_{lim}	0,036	0,031	0,033

ры связывания с ДНК по описанным выше моделям конкурентного связывания (таблица).

Как следует из данных, представленных в таблице, *Модель 1* позволяет достаточно хорошо описывать спектральные изменения, происходящие в системах нуклеозид–ДНК–ЭБ, поскольку для всех нуклеозидов существует область значений n_1 и n_2 , при которых $Q < Q_{lim}$. Найденная оптимальная величина места связывания n_1 для всех нуклеозидов примерно одинакова и равна одному основанию ДНК на связанную молекулу нуклеозида.

Поскольку, как изложено выше, ЭБ может формировать с ДНК два типа комплексов с разными молярными коэффициентами экстинкции, для тех же нуклеозидов мы рассчитали параметры связывания по *Модели 2* при фиксированной величине места связывания $n_1 = 1$ (таблица).

Показано, что *Модель 2* также достаточно хорошо описывает концентрационные изменения спектров смесей ЭБ–ДНК–нуклеозид, поскольку для каждой из рассмотренных систем существует область значений n_1 и n_2 , при которых $Q < Q_{lim}$. Определено, что величины констант связывания 6AZC и AZAxyl с ДНК, рассчитанные по двум разным моделям, практически совпадают. Это может

свидетельствовать о том, что два упомянутых нуклеозида нечувствительны к изменениям молярного коэффициента экстинкции связанного ЭБ в области низких значений P/D , так как являются конкурентами только по второму типу комплексов. Различия в величинах констант связывания AZAfur с ДНК, найденные по разным моделям, требуют более детального анализа, однако по аналогии с выводами, сделанными выше, можно предположить, что AZAfur способен быть конкурентом не только по второму, но и по первому типу связывания ЭБ. Из данных, приведенных в таблице, также следует, что на величину константы связывания каждого из нуклеозидов с ДНК влияют строение гликозидных фрагментов нуклеозидов и их конформация.

Поскольку рассчитанная величина места связывания 6AZC, AZAfur и AZAxyl с ДНК является величиной порядка одного основания на молекулу лиганда, это свидетельствует, во-первых, об отсутствии АТ-, ГЦ-специфичности связывания этих лигандов с ДНК и, во-вторых, о том, что они не интеркалируют в ДНК, так как при интеркаляции величина места связывания должна быть 4–5 оснований ДНК на связанную молекулу лиганда. Можно предположить, что комплексообразование 6AZC, AZAfur и AZAxyl с ДНК происходит за счет образования водородной связи между азагруппой нуклеозидов (атом азота N-6 триазиновых оснований) и аминогруппами оснований ДНК, с которыми взаимодействует и ЭБ, связываясь по типу классической интеркаляции [32].

Выводы. Спектрофотометрическое исследование связывания цитидина и его аналогов с ДНК в присутствии ЭБ продемонстрировало, что ЭБ может служить красителем, позволяющим фиксировать связывание тестируемых лигандов с ДНК методом абсорбционной спектрофотометрии в видимой области спектра. Сравнительным анализом кривых титрования смесей ЭБ–ДНК–нуклеозид выявлено, что цитозиновые нуклеозиды, немодифицированные по основанию (Cyd и Aga-C), не являются конкурентами ЭБ при его связывании с ДНК по второму типу комплексов. С другой стороны, в их присутствии меняется характер связывания ЭБ с ДНК в области низких значений $P/D_{ЭБ}$ (при его плотной упаковке на матрице ДНК). В то же время

цитидиновые аналоги (6AZC, AZAfur и AZAxyl) конкурируют с ЭБ за места связывания на ДНК по типу классической интеркаляции в области высоких значений P/D .

Можно предположить, что во взаимодействии этих производных с ДНК участвуют как азагруппа основания, так и модифицированный гликозидный фрагмент нуклеозидов. Показано, что систему уравнений (1)–(4) и соответственно модель конкурентного связывания двух лигандов с ДНК, предложенные Нечипуренко [17], можно применять для расчета равновесного состава и параметров связывания в системах нуклеозид–ДНК–ЭБ, а программному оптимизации СОМР [20] – для нахождения на основе данных спектрофотометрического титрования оптимальных мест связывания и констант комплексообразования для каждого из конкурирующих лигандов. Установлено, что величины констант ассоциации 6AZC и AZAxyl с ДНК, рассчитанные по двум моделям связывания, практически совпадают, а для AZAfur, не имеющего ОН-групп в фурановом кольце, – существенно различаются. Константы связывания 6AZC и AZAfur с ДНК значительно больше по величине, чем у AZAxyl, следовательно, строение гликозидных фрагментов нуклеозидов и их конформация довольно сильно влияют на их связывание с ДНК.

Ie. L. Iermak, O. B. Kruglova, L. H. Palchykovska, I. V. Alexeeva

Spectrophotometrical study of mechanisms of cytidine analogues and ethidium bromide binding with DNA

Summary

To study the mechanisms of cytidine and its biologically active analogues binding to DNA we analyzed the binding of these ligands to the DNA in the presence of well-known intercalator ethidium bromide (EtBr). Thereto, we carried out the detailed spectrophotometric research of EtBr-DNA mixtures absorption in the presence of cytidine and its analogues in the wide range of wavelengths and DNA concentrations. Cytidine derivatives containing azagroup in the cytosine ring (6AZC, AZAfur, and AZAxyl) compete with EtBr for the DNA binding sites. The binding constants and binding site sizes of the ligand-DNA complexes were calculated via absorption spectra optimization programs COMP and DALSMOD. Unmodified in cytosine ring ligands (cytidine and Ara-C) do not compete with EtBr for the DNA binding sites, however they contribute to the change of concentration dependencies of titration curves in the region of low DNA concentrations.

Keywords: cytidine analogues, DNA, models of binding, spectrophotometry, ethidium bromide.

Є. Л. Ермак, О. Б. Круглова, Л. Г. Пальчиковська, І. В. Алексєєва

Спектрофотометричне дослідження механізмів зв'язування аналогів цитидину і бромистого етидію з ДНК

Резюме

Для з'ясування механізмів зв'язування цитидину і його біологічно активних похідних з ДНК досліджено їхню взаємодію з ДНК у присутності інтеркалятора бромистого етидію (ЕБ). Здійснено детальний спектрофотометричний аналіз електронних спектрів поглинання сумішей ЕБ–ДНК за присутності цитидину і його аналогів у широкій області довжин хвиль і концентрацій ДНК. Аналоги цитидину, що містять додатковий атом азоту у гетероциклі (6AZC, AZAfur та AZAxyl), конкурують з ЕБ за місця зв'язування на ДНК. Константи асоціації і величини місць зв'язування утворюваних комплексів для цих похідних розраховано нами за допомогою програм оптимізації спектрів поглинання сумішей ЕБ–ДНК–нуклеозид COMP та DALSMOD. Немодифіковані по цитозиновому кільцю нуклеозиди (цитидин та Ara-C) не є конкурентами ЕБ за місця зв'язування на ДНК, але у їхній присутності змінюється характер концентраційних залежностей кривих титрування в області низьких концентрацій ДНК. Це можна пояснити впливом зазначених нуклеозидів на структурні та конформаційні зміни матриці ДНК за присутності ЕБ в області низьких значень $P/D_{ЕБ}$, де $P/D_{ЕБ}$ – відношення загальних концентрацій ДНК та ЕБ.

Ключові слова: аналоги цитидину, ДНК, моделі зв'язування, спектрофотометрія, бромистий етидію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology // *Adv. Cancer. Res.*–1998.–72.–P. 197–233.
2. Grem J. L., Shoemaker D. D., Hoth D. F., King S. A., Plowman J., Zaharko D., Grieshaber C. K., Harrison S. D. Jr., Craddock J. C., Leyland-Jones B. Arabinosyl-5-azacytosine: a novel nucleoside entering clinical trials // *Invest. New Drugs.*–1987.–5, N 4.–P. 315–328.
3. Hoelzer D., Ganser A., Anger B., Seifried E., Heimpel H. Low-dose Ara-C in the treatment of acute leukemia cytotoxicity or differentiation induction? // *Ann. Hematol.*–1984.–48, N 4.–P. 233–238.
4. Capizzi R. L., Poole M., Cooper M. R., Richards F., Stuart J. J., Jackson D. V., White D. R., Spurr C. L., Hopkins J. O., Muss H. B. Treatment of poor risk acute leukemia with sequential high-dose ARA-C and asparaginase // *Blood.*–1984.–6, N 3.–P. 694–700.
5. Hoshino J., Frahm J., Kroger H. Suppression of nuclear ADP-ribosyltransferase activity in Ehrlich ascites tumor cells by 5-azacytidine and its analogs // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*–1987.–142, N 2.–P. 468–474.
6. Oyelere A. K., Kardon J. R., Strobel S. A. pKa perturbation in genomic hepatitis Delta virus ribozyme catalysis evidenced by nucleotide analogue interference mapping // *Biochemistry.*–2002.–41.–P. 3667–3675.
7. Zhang X., Kiechle F. L. Cytosine arabinoside substitution decreases transcription factor-DNA binding element complex formation // *Arch. Pathol. Lab. Med.*–2004.–128, N 12.–P.1364–1371.

8. *Estey E., Thall P., Beran M., Kantarjian H., Pierce S., Keating M.* Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia IAML) on outcome of AML-type chemotherapy // *Blood.*—1997.—**90**.—P. 2969–2977.
9. *Носач Л. М., Дяченко Н. С., Шаламай А. С., Алексеева И. Н., Кушко Л. Я., Озвничук И. И., Жовноватая В. Л., Бутенко С. И., Петровская И. А., Дранник Г. Н.* Антиаденовирусное и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина // *Биополимеры и клетка.*—1996.—**12**, № 1.—С. 75–85.
10. *Абдуллаева М. В., Фролов А. Ф., Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Федорова Н. Е.* Ингибирующее действие 6-азацитидина на цитомегаловирусную инфекцию человека в клеточной системе // *Биополимеры и клетка.*—2004.—**20**, № 4.—С. 337–342.
11. *Галушко С. В., Булкина З. П., Петруша Н. А., Шишкина И. П.* Фармакокинетика 6-азацитидина // *Хим.-фарм. журн.*—1986.—**20**, № 11.—С. 1302–1305.
12. *Пальчиковська Л. Г., Гарманчук Л. В., Алексеева І. В., Усенко Л. С., Шестакова Т. С., Соляник Г. І., Швед А. Д., Чехун В. Ф.* N1-глікозидні аналоги 6-азацитидину. II. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію in vitro // *Биополимеры и клетка.*—2005.—**21**, № 5.—С. 432–438.
13. *Samijlenko S. P., Alexeeva I. V., Palchykivs'ka L. H., Kondratyuk I. V., Stepanygin A. V., Shalamay A. S., Novorun D. M.* ¹H NMR investigation on 6-azacytidine and its derivatives // *Spectrochim. Acta, Part A.*—1999.—**55**.—P. 1133–1141.
14. *Пальчиковська Л. Г., Платонов М. О., Алексеева І. В.* Механізм взаємодії N-1 глікозидів 6-азацитозину з каталітичним сайтом ДНК-залежної РНК полімерази фага T7: модельне неемпіричне квантово-хімічне дослідження // *Биополимеры и клетка.*—2005.—**21**, № 6.—С. 561–563.
15. *Muller W., Crothers D. M.* Interaction of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands // *Eur. J. Biochem.*—1975.—**54**.—P. 267–277.
16. *Bresloff J. L., Crothers D. M.* DNA-ethidium reaction kinetics: demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites // *J. Mol. Biol.*—1975.—**95**.—P. 103–123.
17. *Nechipurenko Yu. D.* Cooperative effects on binding of large ligands to DNA. II. Contact cooperative interactions between bound ligand molecules // *J. Mol. Biol.*—1984.—**18**.—P. 1066–1079.
18. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*—1974.—**86**.—P. 469–489.
19. *Круглова Е. Б., Ермак Е. Л.* Конкурентное связывание двух лигандов: актиноцинового производного и кофеина с полирибозитидиловой кислотой в разных конформационных состояниях // *Вестн. Харьк. ун-та. Биофиз. вестн.*—2004.—Вып.1–2 (14)—С. 32–37.
20. *Круглова Е. Б.* Необычные формы изотерм адсорбции в трехкомпонентных системах // *Биофизика.*—2007.—**52**, № 5.—С. 822–824.
21. *Kruglova E. B., Gladkovskaya N. A., Maleev V. Ya.* Use spectrophotometric analysis to calculate the thermodynamic parameters of binding between an actinocin derivative and DNA // *Biophysics (Rus).*—2005.—**50**, N 2.—P. 243–254.
22. *Maleev V. Ya., Semenov M. A., Kruglova E. B., Bolbukh T., Gasan A., Bereznyak E., Shestopalova A.* Spectroscopic and calorimetric study of DNA interaction with a new series of actinocin derivatives // *J. Mol. Struct.*—2003.—**645**.—P. 145–158.
23. *Harley F. R., Burgess C., Alcock R. M.* Solution equilibria.—London: Ellis Horwood, 1980.—360 p.
24. *Vardevanyan P. O., Antonyan A. P., Parsadanyan M. A., Davtyan H. G., Karapetyan A. T.* The binding of ethidium bromide with single- and double stranded structures // *Exp. Mol. Med.*—2003.—**35**, N 6.—P. 527–533.
25. *Minasyan S. H., Tavadyan L. A., Antonyan A. P., Davtyan H. G., Parsadanyan M. A., Vardevanyan P. O.* Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA // *Bioelectrochemistry.*—2006.—**68**.—P. 48–55.
26. *Vardevanyan P. O., Antonyan A. P., Manukyan G. A., Karapetyan A. T.* Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA // *Exp. and Mol. Med.*—2001.—**33**, N 4.—P. 205–208.
27. *Benevides J. M., Thomas G. J., Jr.* Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation // *Biochemistry.*—2005.—**44**, N 8.—P. 2993–2999.
28. *Yuzaki K., Hamaguchi H.* Interaction-induced structural change of DNA as studied 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy // *J. Raman Spectrosc.*—2004.—**35**, N 12.—P. 1013–1015.
29. *Utsuno K., Tsuboi M., Katsumata S., Iwamoto T.* Viewing of complex molecules of ethidium bromide and plasmid DNA in solution by atomic force microscopy // *Chem. Pharm. Bull.*—2001.—**49**, N 4.—P. 413–417.
30. *Vladesku I. D., McCauley M. J., Rouzina I., Williams M. C.* Mapping the phase diagram of single DNA molecule force-induced melting in the presence of ethidium // *Phys. Rev. Lett.*—2005.—**95**, N 15.—P. 1–4.
31. *Eckel R., Ros R., Ros A., Wilking S. D., Sewald N., Anselmetti D.* Identification of binding mechanisms in single molecule–DNA complexes // *Biophys. J.*—2003.—**85**.—P. 1968–1973.
32. *Garbett N. C., Hammond N. B., Graves D. E.* Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA // *Biophys. J.*—2004.—**87**.—P. 3974–3981.

УДК 577.323:539.6.199
Надійшла до редакції 03.06.07