

УДК 577.32:[577.2:539.1.04]+577.346

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ СМЕСЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ДНК КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ В МОЛЕКУЛАХ ДНК

**Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская**

*Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры 12, г. Харьков, 310085,  
kruglova@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 4 октября 1999 г.

Недавно мы обнаружили, что молекулы ДНК, выделенные из эпидидимуса крыс популяции Вистар, подвергавшихся гамма-облучению в низких дозах, и контрольные молекулы ДНК по-разному взаимодействуют с некоторыми пиримидиновыми нуклеозидами (NUC). Используя кривые плавления смесей ДНК-NUC для модельных образцов ДНК в УФ-области можно показать, что эти различия связаны с конформационными изменениями молекул ДНК. Модельные образцы ДНК были получены путем частичной денатурации тимусной ДНК в бессолевых водных растворах. Уровень повреждений молекул ДНК в таких растворах зависит от концентрации ДНК. Показано, что такие повреждения в ДНК приводят к изменениям в кривых плавления смесей ДНК-NUC, которые подобны таким же для ДНК из облученных тканей. Также мы показываем, что механизмы связывания цитозина арабинозида (Ara-C) и 6-азациитидина (6AZC) с молекулами ДНК, имеющими модифицированную вторичную структуру, различны.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДНК, малые дозы радиации, кривые плавления, спектрофотометрия, цитозин арабинозид, 6-азациитидин, бессолевые растворы ДНК.

Ранее нами было показано [1,2], что молекулы ДНК, выделенные из эпидидимуса семенников крыс популяции Вистар, подвергавшихся  $\gamma$ -облучению в низких дозах в условиях Чернобыльской зоны, по-разному взаимодействуют с рядом биологически активных нуклеозидов (NUC). Также было показано, что наблюдаемые различия связаны с нарушением системы водородных связей и стекинга оснований, с модификацией сахарофосфатного остова при больших дозах облучения (25-50) сГр, что приводит к структурной деградации молекул ДНК [3]. Хорошо известно, что возникающие в геноме животных при радиационном воздействии разные типы повреждений, зависят от дозы и характера облучения. Одно- и двухнитевые разрывы [4], образование ДНК-ДНК и ДНК-белковых сшивок [5], появление химически модифицированных оснований [6-8], образование апуриновых мест [9] и пр. могут приводить к существенным структурным изменениям в хроматине. Однако, в процессе выделения ДНК в местах таких точечных повреждений могут образовываться локально нестабильные участки в виде петель, смешанных пар, шпилек, существенно изменяющих вторичную и третичную структуру молекул ДНК. Целью данной работы было (1) определить, как такие неспецифические изменения в конформации молекул ДНК, моделируемые путем частичной денатурации ДНК в бессолевом водном растворе, влияют на связывание различных терапевтически активных нуклеозидов, (2) выяснить, могут ли такие изменения в конформации молекул ДНК моделировать эффекты, наблюдаемые нами при изучении связывания ДНК с NUC для образцов ДНК из эпидидимуса облученных крыс.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе были использованы тимусная ДНК фирмы "Serva", а также образцы ДНК, выделенные из эпидидимуса семенников крыс популяции Вистар, подвергавшихся хроническому  $\gamma$ -облучению в условиях зоны Чернобыльской АЭС. Методика выделения препаратов ДНК и контроль их качества описаны ранее [1,2].

Биологически активные нуклеозиды цитозин арабинозид (Ara-C) и 6-азациитидин (6AZC) синтезированы в институте Молекулярной биологии и генетики НАН Украины г. Киева и использовались нами без дополнительной очистки. Спектрофотометрические измерения кривых плавления ДНК и смесей ДНК-NUC проводили в 0.01SSC буферном растворе (ISSC - 0,15 М NaCl + 0.015 М цитрата Na) и в растворах NaCl в интервале концентраций ( $6 \times 10^{-4}$  -  $6 \times 10^{-3}$ ) М. Модельные образцы деградированной ДНК готовили путем добавления фиксируемых объемов бидистиллированной воды к точным объемам концентрированного водного раствора тимусной ДНК при температуре 20 °С. Затем в полученные бессолевые водные растворы ДНК с концентрацией  $C_p^W$  добавлялся раствор NaCl для создания необходимых концентраций ионов  $Na^+$ . Конечная концентрация ДНК в солевом растворе составляла  $C_p^S = (1-1,2) \times 10^{-4}$  М. К полученным растворам ДНК добавлялись микроколичества исследуемых нуклеозидов Ara-C и 6AZC (NUC). Поскольку конечные концентрации ДНК и NUC во всех смесях выдерживались практически постоянными, сравнение получаемых кривых плавления при одних и тех же ионных силах позволяло оценивать влияние степени расплетения молекул ДНК в бессолевом водном растворе на характер связывания ДНК с рассматриваемыми NUC.

Кривые плавления свободных образцов ДНК и смесей ДНК-NUC были получены в УФ-области спектра путем выдерживания растворов в каждой из температурных точек в течение 8 минут (точность измерения

температуры  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ ). Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевых термостатированных кюветках с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре "Specord M40". Концентрацию ДНК и лигандов рассчитывали используя следующие значения молярных коэффициентов экстинкции:  $\epsilon_{260}(\text{P}) = 6400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для ДНК,  $\epsilon_{270} = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для Ага-С и  $\epsilon_{265} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для 6AZC. Величины гиперхромных эффектов для свободных образцов ДНК и их смесей с NUC рассчитывались, как было описано в [1].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Для оценки степени влияния разных типов повреждений в молекулах ДНК на связывание ряда биологически активных нуклеозидов, мы исследовали кривые плавления свободной ДНК и ее смесей с NUC при одних и тех же концентрациях компонентов. На рис.1 и рис.2 приведены кривые плавления ДНК из разных тканей для двух NUC: Ага-С и 6AZC, отличающихся строением фуранозного кольца и основания [1,2]. Хорошо видно, что рассмотренные лиганды связываются только с образцами ДНК, выделенными из эпидидимуса облученных животных, что выражается в смещении кривых плавления смесей ДНК-NUC относительно кривой плавления соответствующей свободной ДНК в область более высоких температур (рис.1, 2, в).

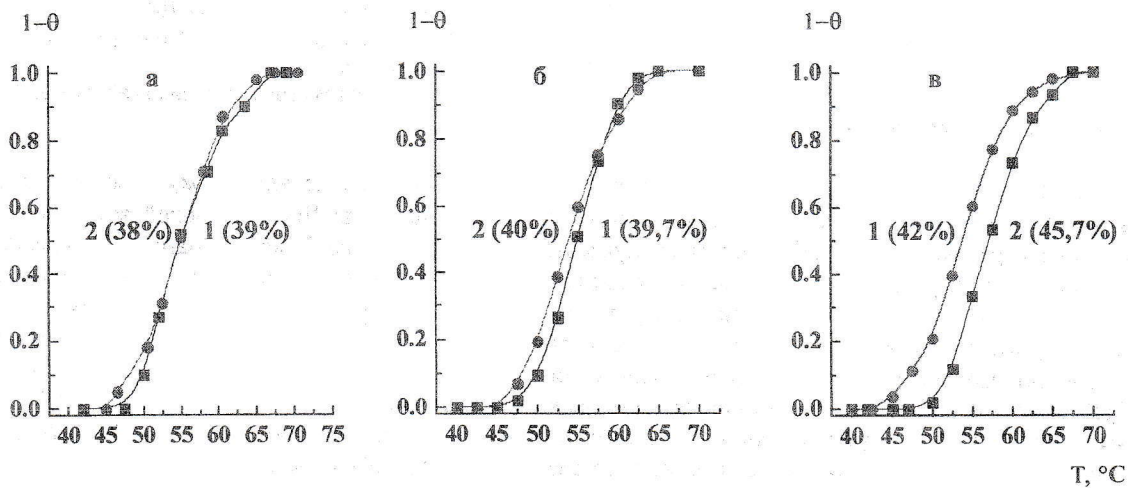


Рис.1. Кривые плавления тимусной ДНК (а) и ДНК, выделенной из эпидидимуса семенников 12-ти месячных контрольных (б) и облученных с ПД=57 сГр (в) крыс в отсутствие (1) и в присутствии (2) 6AZC ( $0.01 \text{ M SSC}$ ,  $C_p = (1,0 - 1,1) \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{6AZC} = 6,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ )

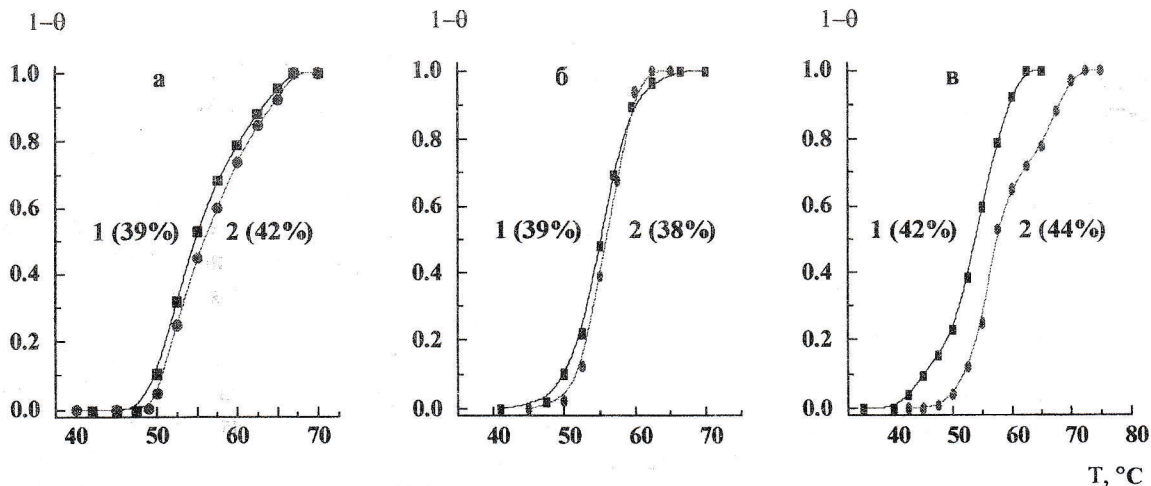


Рис.2. Кривые плавления тимусной ДНК (а) и ДНК, выделенной из эпидидимуса семенников 12-ти месячных контрольных (б) и облученных с ПД=57 сГр (в) крыс в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ага-С ( $0,01 \text{ M SSC}$ ,  $C_p = (1,0-1,2) \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{\text{Ага-С}} = 10^{-4} \text{ M}$ ).

Для двух контрольных образцов ДНК (ДНК из тимуса теленка и ДНК из эпидидимуса необлученных 12-ти месячных крыс) практически не наблюдается изменений в кривых плавления смесей ДНК-NUC по сравнению с кривыми плавления свободной ДНК (рис.1, 2, а, б). Величины гиперхромных эффектов (указаны в скобках у каждой кривой) также меняются незначительно. Различия в профилях кривых плавления и величинах смещения  $\Delta T_m$  в случае облученных образцов ДНК (рис.1, 2, в), указывают на разный механизм связывания Ага-С и 6AZC с деградированной при облучении животных матрицей ДНК. Поскольку температура плавления смесей ДНК-NUC для этих образцов ДНК повышается по сравнению с такой же для свободной ДНК, можно заключить, что при связывании лигандов происходит стабилизация локально неустойчивых участков ДНК [10].

Для более детального ответа на вопрос, как различные типы повреждений в двойной спирали ДНК могут влиять на процесс связывания рассмотренных нуклеозидов, мы исследовали кривые плавления модельных, деградированных в бессолевых водных растворах, образцов ДНК. Модельные образцы ДНК получали как описано в разделе "Материалы и методы".

Как было показано нами ранее [11], степень расплетения тимусной ДНК в бессолевом водном растворе, выраженная как  $\gamma_T = (A_T^W - A_T^S)/A_T^S \times 100$  (%), где  $A_T^W$  и  $A_T^S$  - поглощения водного и солевого растворов ДНК при одной и той же концентрации и температуре, меняется с ростом концентрации ДНК при  $T=20$  °C следующим образом: в интервале  $C_p^W = (0-2) \cdot 10^{-4}$  М наблюдается некоторый рост степени расплетения, который достигает максимальной величины в области концентраций  $C_p^W = (2-3) \cdot 10^{-4}$  М, а затем при дальнейшем росте концентрации ДНК величина  $\gamma$  постепенно уменьшается.

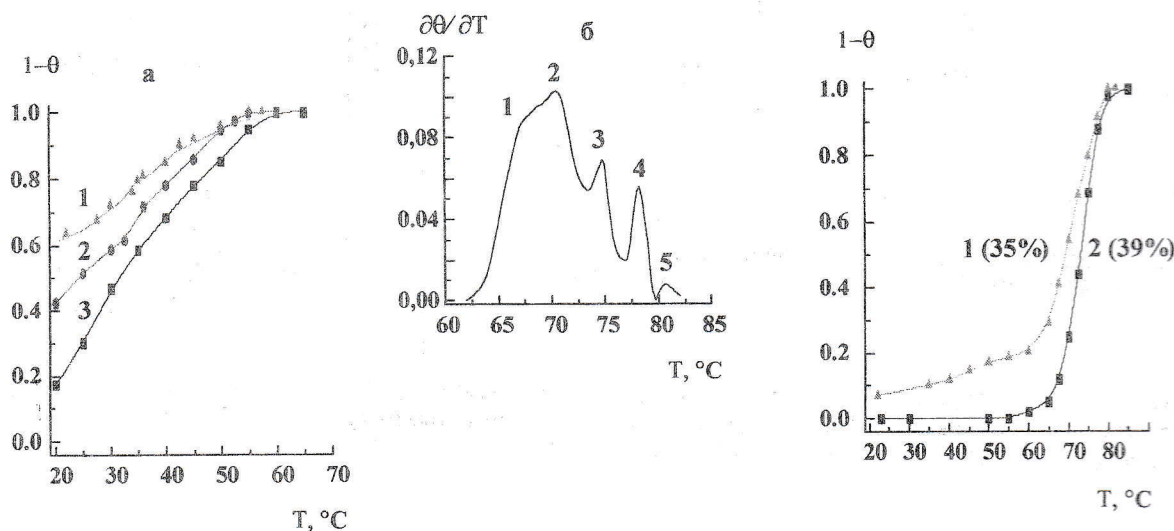


Рис.3. Кривые плавления тимусной ДНК в бессолевом водном растворе в зависимости от концентрации ДНК:  $C_p^W = 2,5 \cdot 10^{-4}$  М (1);  $C_p^W = 1,6 \cdot 10^{-4}$  М (2);  $C_p^W = 7,5 \cdot 10^{-5}$  М (3) (а); дифференциальная кривая плавления, полученная для тимусной ДНК в 0,1 SSC [12] (б).

Рис.4. Кривые плавления тимусной ДНК после добавления в бессолевой водный раствор с  $C_p^W = 1,2 \cdot 10^{-4}$  М раствора NaCl до конечной концентрации  $C_{NaCl} = 6 \cdot 10^{-3}$  М (1); раствор ДНК той же концентрации в  $6 \cdot 10^{-3}$  М NaCl (2).

На рис.3, а приведены типичные кривые плавления тимусной ДНК в бессолевом водном растворе в зависимости от  $C_p^W$ . Видно, что в области комнатных температур максимально возможная степень расплетения  $1-\theta = 0,6$ . Она наблюдается для  $C_p^W = 2,5 \cdot 10^{-4}$  М, что соответствует величине  $\gamma = 24 \pm 1$  %. Учитывая блочную структуру тимусной ДНК, которая четко проявляется на дифференциальной кривой плавления [12] (рис.3, б), можно предположить, что максимальная степень расплетения, достигаемая ДНК в бессолевом водном растворе, соответствует практически полному расплетению 1 и 2 блоков ( $\gamma = 28$  %), поскольку именно такой вклад относительно всего перехода (площадь под всей кривой соответствует 40%) составляют эти блоки. Дальнейший рост концентрации ДНК ( $C_p^W \geq 3 \cdot 10^{-4}$  М) приводит к уменьшению степени расплетения, что можно объяснить увеличением концентрации ионов  $Na^+$  в растворе за счет противоионов и примесных ионов. Труднее объяснить уменьшение степени расплетения при комнатных температурах в области низких концентраций ДНК ( $C_p^W \leq 10^{-4}$  М) (рис.3,а, кривые 2, 3). В этой области концентраций разброс в определяемых величинах  $\gamma_T$  при комнатных температурах больше, чем в других концентрационных областях, а способ приготовления растворов существенно влияет на конечный результат. Этот факт свидетельствует о ряде необратимых процессов денатурации - ренатурации в таких системах при низких концентрациях ДНК. Не исключено, что определенный вклад в необратимость процесса денатурации-ренатурации вносит и частичная протонизация оснований нуклеиновых

кислот в области  $pH \geq 5$  в условиях очень низких ионных сил в бессолевых водных растворах [11, 13]. При концентрации ДНК  $C_p^W \geq (8-9) \times 10^{-4}$  М тимусная ДНК в бессолевом водном растворе находится в нативном состоянии, что подтверждается выводами ряда работ [13].

При добавлении NaCl в приготовленные при  $T=20^\circ\text{C}$  бессолевые растворы ДНК, происходит их частичная ренатурация, которая сопровождается увеличением гиперхромного эффекта до (30-35) % даже в случае максимальных степеней расплетения (кривая 1, рис.4, 5, 6). Температурный переход таких образцов ДНК имеет явно выраженный двухфазный характер, причем в области более низких температур, очевидно, выплавляется большая часть изначально денатурированных участков молекул ДНК.

При добавлении исследуемых лигандов к приготовленным таким образом денатурированным-ренатурированным растворам ДНК мы фиксируем значительные изменения в кривых плавления смесей ДНК-NUC по сравнению с кривыми плавления свободных образцов ДНК (рис.5 и рис.6).

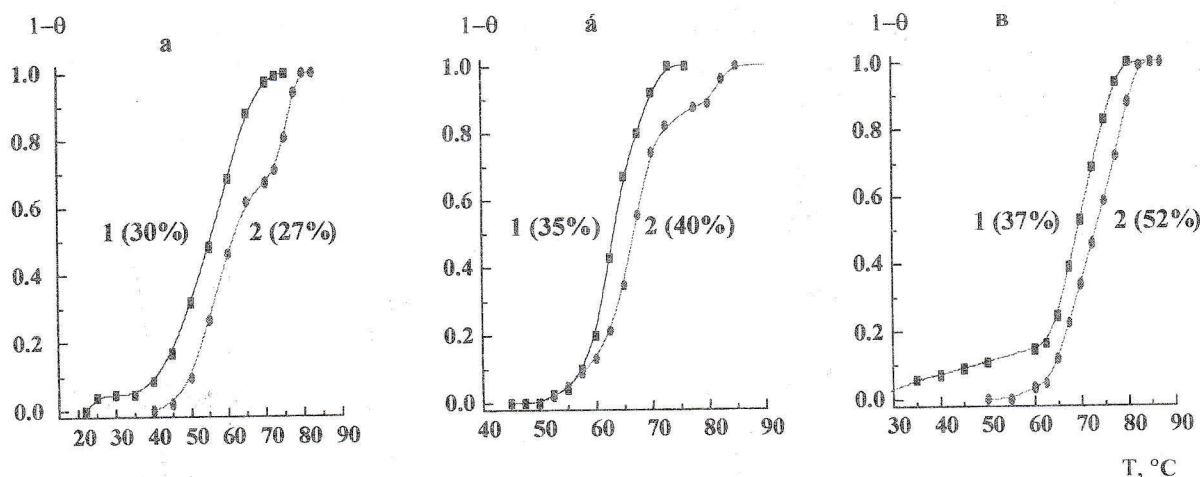


Рис.5. Кривые плавления тимусной ДНК в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ага-С для образцов ДНК, частично денатурированных в бессолевых водных растворах при:  $C_p^W = 1,6 \times 10^{-4}$  М и ренатурации при  $6 \times 10^{-4}$  М NaCl (а);  $C_p^W = 3,5 \times 10^{-4}$  М,  $6 \times 10^{-3}$  М NaCl (б);  $C_p^W = 4,2 \times 10^{-4}$  М,  $6 \times 10^{-3}$  М NaCl (в) ( $C_p^S = 1,2 \times 10^{-4}$  М,  $C_{Ara-C} = 1 \times 10^{-4}$  М)

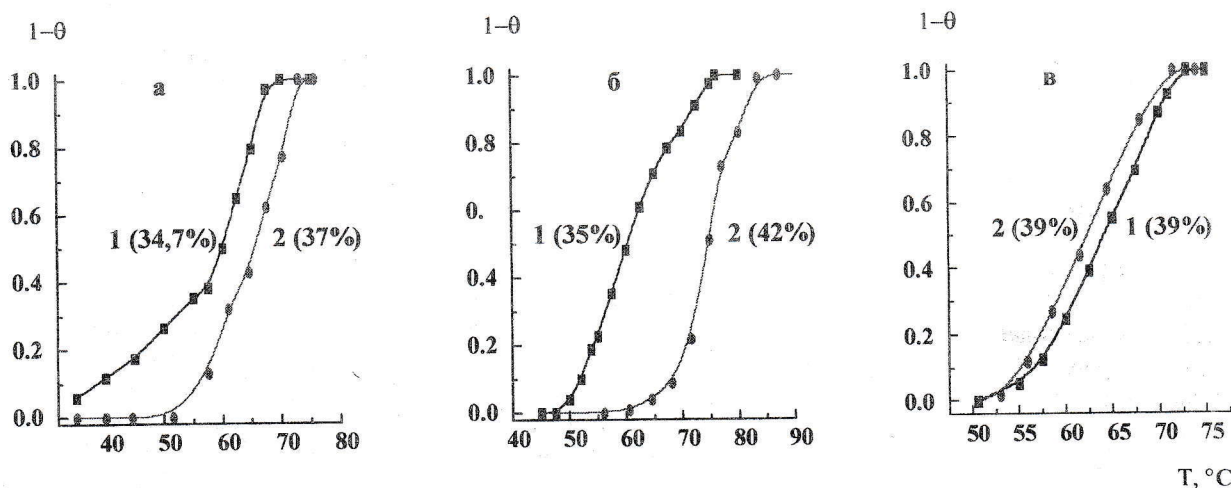


Рис.6. Кривые плавления тимусной ДНК в отсутствие (1) и в присутствии (2) 6AZC для образцов ДНК, приготовленных путем частичной денатурации ДНК в бессолевых водных растворах при  $C_p^W = 7 \times 10^{-5}$  М (а);  $C_p^W = 3,5 \times 10^{-4}$  М (б);  $C_p^W = 7 \times 10^{-4}$  М (в) и ее дальнейшей ренатурации в  $3 \times 10^{-3}$  М NaCl ( $C_p^S = (1,3-1,6) \times 10^{-4}$  М,  $C_{6AZC} = 8,9 \times 10^{-5}$  М).

Так, из рис. 5 и 6 видно, что деградация молекул ДНК в бессолевом водном растворе приводит к связыванию рассмотренных NUC с ДНК, причем изменения в профилях кривых плавления очень похожи на такие же, фиксируемые нами для ДНК из эпидидимуса облученных животных (рис.1, в и рис.2, в). Также как и в случае облученных ДНК, наблюдается смещение кривой плавления смеси ДНК-NUC в область более высоких температур

по сравнению с кривой плавления свободной ДНК, меняются величины гиперхромных эффектов. Величина смещения  $\Delta T_m$  в присутствии 6AZC в большей степени, чем для Ага-С, зависит от уровня расплетения ДНК в бессолевом растворе и достигает величины порядка  $15^\circ \text{C}$  при максимальной степени расплетения (рис.6, б). Хорошо видно, что 6AZC в процессе связывания стабилизирует в основном те участки ДНК, которые в бессолевом водном растворе находились в денатурированном состоянии и связывание лиганда сопровождается увеличением гиперхромного эффекта. В случае очень низкой степени расплетения, наблюдающейся для бессолевых водных растворов ДНК с  $C_p^w \geq 9 \times 10^{-4} \text{ M}$ , при добавлении 6AZC мы не фиксировали высокотемпературных смещений кривых плавления смеси ДНК-6AZC и величина гиперхромного эффекта практически не менялась (рис.5, в).

Характер изменений кривых плавления модельных образцов ДНК в смеси с Ага-С отличен от таких же изменений для 6AZC (Рис.5). Видно, что в отличие от 6AZC, Ага-С не стабилизирует, а дополнительно расплетает те участки ДНК, которые были расплетены в бессолевых водных растворах, понижая тем самым гиперхромный эффект (рис.5, а). С другой стороны, Ага-С связывается более интенсивно с нерасплетенными участками, что сопровождается увеличением гиперхромного эффекта (рис.5, б, в). Профили кривых плавления смесей ДНК-Ага-С в случае модельных ДНК носят ярко выраженный двухфазный характер, но величины смещения  $\Delta T_m$  значительно ниже, чем для 6AZC.

Таким образом, анализ кривых плавления смесей ДНК-6AZC и ДНК-Ага-С для модельных образцов ДНК позволяет заключить, что оба лиганда связываются с молекулами ДНК с модифицированной вторичной структурой. Можно предположить, что стабилизация такой ДНК происходит в результате гидрофобного связывания незаряженных нуклеозидов при их размещении в локально нестабильных (петли, шпильки, смешанные пары и пр.) областях. Этот процесс сопровождается увеличением гиперхромного эффекта.

В отличие от 6AZC, который стабилизирует деградированные в процессе денатурации-ренатурации участки, для Ага-С характерна некоторая избирательность в стабилизации ДНК. Так для Ага-С, при частичной денатурации ДНК, места связывания в спиральных GC-обогащенных областях становятся более доступными, с другой стороны, Ага-С не стабилизирует, или даже дополнительно дестабилизирует, те участки ДНК, которые были денатурированы в бессолевом водном растворе.

Сравнивая кривые плавления смесей ДНК-Ага-С и ДНК-6AZC для модельных ДНК и ДНК из эпидидимуса облученных животных, можно отметить подобие наблюдаемых эффектов. Так, в случае ДНК из эпидидимуса 4-х месячных крыс, облученных в дозе 5 сГр [1], для смесей ДНК-Ага-С на фоне небольшого смещения температуры плавления смеси в высокотемпературную область, наблюдается значительное уменьшение гиперхромного эффекта. Для ДНК из эпидидимуса 12-ти месячных крыс, облученных в дозе 50 сГр, такое же изменение  $T_m$  смеси, наоборот, сопровождается увеличением гиперхромного эффекта, как было показано выше. Это свидетельствует о разном уровне и типе повреждений этих двух образцов ДНК.

Поскольку в процессе получения модельных образцов ДНК мы не меняли молекулярного веса тимусной ДНК и не могли химически модифицировать основания нуклеиновой кислоты (за исключением возможной протонизации АТ-пар [11,13]), можно заключить, что изменения в характере взаимодействия рассмотренных лигандов с ДНК связаны с нарушением ее вторичной структуры, т.е. с увеличением концентрации нестабильных участков в ДНК. Этот вывод позволяет предположить, что в случае образцов ДНК из облученных тканей, изменения в характере связывания Ага-С и 6AZC с ДНК также связаны с модификацией вторичной структуры ДНК в местах ее точечных радиационных повреждений. Другими словами, в настоящий момент нет оснований считать, что рассмотренные нуклеозиды позволяют тестировать какие-либо специфические типы повреждений в молекулах ДНК из эпидидимуса облученных крыс. Тем не менее, можно утверждать, что терапевтическое действие рассмотренных нуклеозидов связано именно с их способностью взаимодействовать с молекулами ДНК, имеющими определенные дефекты в структуре.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Круглова Е.Б., Крутько Н.А., Красницкая А.А. и др. // Вісн.ХДУ №422. Біофізичний вісник. 1998. Вип.2. С.100-104.
2. Kruglova E.B., Krasnitskaya A.A., Maleev V.Ya. et. al. 2-nd International conference: Long-term health consequences of the chernobyl disaster, Kiev. 1998. P.262-263.
3. Круглова Е.Б., Довбешко Г.И., Крутько Н.А. и др. // Вісн.ХДУ № 450. Біофізичний вісник. 1999. Вип.4 (2). С. 92-95
4. Xarpos M.A., Pogozelski W.K. // Radiat. Res. 1996. 146. P.669-673.
5. Шугалий А.В., Личина М.В., Жижилина Г.П., Скалацкая С.И. // ДАН. 1996. Т.350. С.828-830.
6. Ide H., Kow Y.W., Chen B.X. et. al. // Cell Biol.Toxicol. 1997. V.13. P.405-417.
7. Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B. et. al. // Cancer Res. 1998. V.58. P.222-225.
8. Ninaber A., Goodfellow J.M. // J.Biomol.Struc.Dyn. 1998. V.16. P.651-661.
9. Milligan J.R., Aguilera J.A., Wu C.C. et. al. // Radiat.Res. 1997. V.148. P.325-329.
10. Франк-Каменецкий М.Д. // Молекуляр. биология. 1968. Т.2. С. 408-419.
11. Круглова Е.Б. // Биополимеры и клетка. 1992. Т.8. С.56-62.
12. Бабаян Ю.С. Устойчивость нуклеиновых кислот при взаимодействии с биологически активными веществами. Дис. д-р. физ.-мат. наук, Ереван. 1991. 227 С.
13. Davydova O.V., Kuznetsov I.A., Florentiev V.L. // Biopolymers. 1989. V.28. P.605-615.