

УДК 577.323

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 6-АЗАЦИТИДИНА С МОЛЕКУЛАМИ ДНК**Н.А. Гладковская¹, Е.Л. Ермак.¹, Е.Б. Круглова¹, Л.И. Пальчиковская,²
И.В.Алексеева²**¹ИРЭ НАН Украины, ул. Ак.Проскуры, 12, г.Харьков, 61085

e-mail: glad@ire.kharkov.ua

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного, 150, Киев, 03143

Поступила в редакцию 12 декабря 2008

Принята 24 декабря 2008 г.

В работе с помощью метода спектрофотометрии в видимой и УФ областях и численных методов расчета параметров связывания исследовано взаимодействие биологически активного нуклеозида 6-азацитидина (6AZC) с молекулами ДНК с различными структурными изменениями. Рассмотрены смеси 6AZC-ДНК и 6AZC – ДНК – бромистый этидий (ЭБ). Для каждой рассматриваемой модели взаимодействия оптимальные величины n , K и ϵ образующихся комплексов при связывании 6AZC с ДНК рассчитывались в программах оптимизации DALSCOMP и DALSMOD. Показано, что 6AZC не связывается с полностью денатурированной ДНК. При этом взаимодействует с нативной ДНК ($K=5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), частично денатурированной ДНК ($K=2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) и ДНК в комплексе с ЭБ ($K=1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Наибольшая константа связывания 6AZC с ДНК получена для смеси 6AZC – ДНК – ЭБ. Показано, что не только 6AZC влияет на связывание ЭБ с ДНК, но существует и обратный эффект – в присутствии ЭБ 6AZC связывается с нативной ДНК с большей константой. Наиболее предпочтительным объяснением такого поведения при связывании 6AZC с ДНК может оказаться то, что вторичная структура ДНК была изменена в следствие интеркаляции ЭБ. Стехиометрия связывания нуклеозида остается постоянной для всех систем 6AZC с ДНК ($n=1$), т.е. ЭБ не конкурирует непосредственно за места связывания с 6AZC, а рост константы комплексообразования говорит только о том, что изменения структуры матрицы позволяют молекуле 6AZC увеличить активность связывания с ДНК. По-видимому, увеличение связывания 6AZC с модельными образцами ДНК также произошло из-за нарушения ее нативной вторичной структуры, но такие изменения менее выгодны с точки зрения возможности встраивания нуклеозида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, 6-азацитидин, спектрофотометрия, численные методы расчета параметров связывания в системе лиганд - ДНК.

Аналог цитидина, его биоизомер – 6-азацитидин (6AZC) – обладает широким спектром противоопухолевой и противовирусной активности [1, 2, 3]. В литературе описаны результаты опосредованного влияния 6AZC на подавление репродукции вирусов вследствие снижения синтеза вирусной ДНК и вирусных полипептидов [1, 4]. Аналогичный механизм действия 6AZC наблюдается и при ингибировании опухолевого роста, которое в его присутствии связывается с угнетением системы синтеза макромолекул [5, 6]. Однако молекулярные механизмы непосредственного взаимодействия 6AZC с ДНК остаются недостаточно изученными и представляют интерес для дальнейших исследований.

В работе [7] было показано, что при связывании нуклеозидов (NUC) с ДНК не образуются классические комплексы типа интеркаляции или расположения NUC в бороздках. Для незаряженных NUC не характерны и электростатические взаимодействия. Можно предположить, что основные типы взаимодействия таких молекул с нуклеиновыми кислотами (НК) реализуются при их размещении в областях молекул НК с измененной нативной структурой (петли, смешанные пары и т.д.) и при этом могут реализоваться стэкинг – взаимодействия с дополнительным образованием водородных связей между основаниями и/или активными группами НК. Поскольку для

молекул ДНК с измененной двуспиральной структурой количество нестабильных участков увеличивается, степень связывания NUC с ДНК при этом может возрасти. Поэтому представляет интерес расчет и сравнение параметров связывания в системах NUC – ДНК для образцов нативной ДНК и ДНК с измененной структурой.

Изменения в структуре молекул ДНК могут происходить как при воздействии внешних факторов (температура, ионная сила и т.д.), так и в процессе связывания с биологически активными веществами, особенно интеркаляторами. Мы моделировали такие структурные изменения в нативной ДНК двумя способами: (1) путем добавления раствора соли (NaCl) к денатурированной ДНК в бессолевом водном растворе при разных концентрациях ДНК и (2) анализировали состояние молекул ДНК в комплексе с классическим интеркалятором бромистым этидием (ЭБ). Использование ЭБ в качестве лиганда - метки оправдано и с той точки зрения, что он выступает чувствительным индикатором на связывание с ДНК 6AZC в видимой области спектра, в то время как электронные спектры поглощения самого 6AZC лежат в области длин волн поглощения ДНК. Именно из-за совпадения максимумов спектров поглощения 6AZC (и других NUC) и ДНК возможности спектрофотометрического анализа в УФ области для характеристики их связывания считаются достаточно ограниченными. Мы в нашей работе предлагаем такие подходы, при которых сочетание спектрофотометрических измерений и расчетных методов позволяют получить параметры связывания в системах 6AZC-ДНК и 6AZC-ДНК-ЭБ.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были использованы коммерческая ДНК тимуса теленка фирмы “Serva”(42% GC, ДНК). Биологически активный нуклеозид 6-азацитидин (6AZC) (рис.1,а), (синтезирован в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины) и мутаген бромистый этидий (ЭБ) фирмы “Sigma”(рис.1,б) использовались нами без дополнительной очистки.

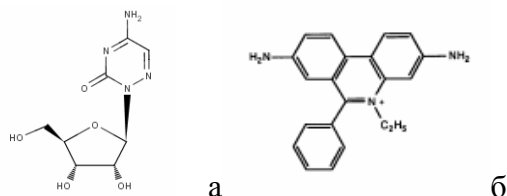
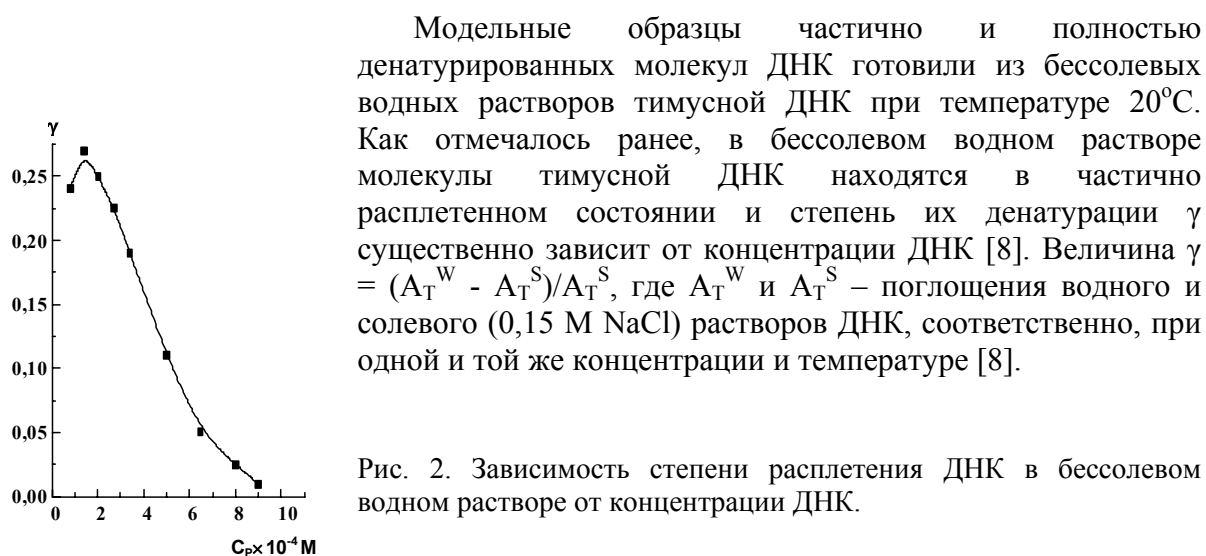


Рис. 1. Структурные формулы 6AZC (а) и бромистого этидия (б).



Модельные образцы частично и полностью денатурированных молекул ДНК готовили из бессолевых водных растворов тимусной ДНК при температуре 20°C. Как отмечалось ранее, в бессолевом водном растворе молекулы тимусной ДНК находятся в частично расплетенном состоянии и степень их денатурации γ существенно зависит от концентрации ДНК [8]. Величина $\gamma = (A_T^W - A_T^S)/A_T^S$, где A_T^W и A_T^S – поглощения водного и солевого (0,15 M NaCl) растворов ДНК, соответственно, при одной и той же концентрации и температуре [8].

Рис. 2. Зависимость степени расплетения ДНК в бессолевом водном растворе от концентрации ДНК.

Как следует из рис. 2 в области достаточно низких концентраций ДНК $C_p \leq 3 \times 10^{-4}$ М, величина γ принимает максимальное значение. При дальнейшем росте концентрации ДНК величина γ резко уменьшается. Образцы частично и полностью расплетенной ДНК готовились из водных бессолевых растворов ДНК с концентрациями $3,5 \times 10^{-4}$ М и 2×10^{-4} М, соответственно. Затем в полученный бессолевой водный раствор ДНК с концентрацией $3,5 \times 10^{-4}$ М добавлялся раствор NaCl ($C_{Na^+} = 6 \times 10^{-3}$ М). Происходила частичная ренатурация ДНК (величина гиперхромного эффекта 30%) [8,9]. В необратимость процесса денатурации – ренатурации ДНК в условиях бессолевых растворов, возможно, вносит вклад частичная протонизация оснований нуклеиновой кислоты [8]. ДНК ($C_p = 2 \times 10^{-4}$ М) в водном растворе находилась практически в полностью расплетенном состоянии (величина гиперхромного эффекта ≈ 10 %). Таким образом, нами были исследованы три модельные системы: нативная ДНК - 6AZC, частично расплетенная ДНК- 6AZC, полностью расплетенная ДНК - 6AZC.

Измерения спектров поглощения смесей 6AZC - ДНК и 6AZC - ДНК – ЭБ при разных значениях P/D , где P/D - отношение концентрации фосфатов ДНК к концентрации лиганда (C_D^0), проводили в термостатированных кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1, 2 и 10 мм на спектрофотометре Specord M40 (Германия) в видимой и УФ областях спектра.

Концентрацию 6AZC и ЭБ рассчитывали, используя значения молярных коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{265} = 10000 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и $\epsilon_{480} = 5850 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [10], соответственно. При определении концентрации (в молях фосфатов) образцов тимусной ДНК использовали значение молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} = 6400 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [11]. Измерения спектров поглощения смесей 6AZC - ДНК – ЭБ проводили в фосфатном ($2,5 \times 10^{-2}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-2}$ М Na_2HPO_4) буферном растворе с $\text{pH} = 6,86$

Модели, используемые для описания взаимодействия 6AZC с ДНК

Для численного анализа спектральных зависимостей в широкой области длин волн и концентраций реагирующих компонентов и определения параметров связывания 6AZC с ДНК в различных системах нами была разработана серия программ оптимизации.

Оптимальные значения констант (K) и величин мест связывания (n), молярных коэффициентов экстинкции (ϵ) комплексов 6AZC - ДНК с различными изменениями в структуре были рассчитаны по программе оптимизации DALIS [12] с помощью системы уравнений закона сохранения действующих масс (ЗДМ):



$$K = \frac{[6AZC - DNA]}{[6AZC][DNA]} \quad (1.2)$$

$$C_{6AZC} = [6AZC] + [6AZC - DNA] \quad (1.3)$$

$$C_{DNA} = [DNA] + [6AZC - DNA] \quad (1.4)$$

Стехиометрия связывания 6AZC с ДНК полагалась равной 1, т.е. 1 молекула лиганда связывается с 1 нуклеотидом.

Расчет параметров связывания 6AZC с ДНК в присутствии ЭБ осуществляли по двум различным моделям с использованием программ оптимизации COMP (Модель 1) и DALSMOD (Модели 2) [13].

Модель 1 описывает конкурентное связывание 6AZC и ЭБ с ДНК с учетом образования только одного типа комплексов на ДНК для каждого из них. Величины мест связывания 6AZC (n_1) и ЭБ (n_2) варьируются в широкой области значений. Для расчета равновесных концентраций свободных и связанных с ДНК 6AZC и ЭБ в каждой смеси ЭБ – ДНК – 6AZC в этом случае мы использовали систему уравнений (2.1) – (2.4).

$$\frac{R_1}{m_1} = K_1 \left[\frac{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R} \right]^{n_1} (1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R) \quad (2.1)$$

$$\frac{R_2}{m_2} = K_2 \left[\frac{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R} \right]^{n_2} (1 - R_1 \times n_1 - R_2 \times n_2 + R) \quad (2.2)$$

$$C_{D1} = m_1 + R_1 \times C_P \quad (2.3)$$

$$C_{D2} = m_2 + 2 \times K_D \times m_2^2 + R_2 \times C_P \quad (2.4)$$

Модель 2 описывает связывание 6AZC с ДНК в предположении, что его величина места связывания на ДНК $n_1=1$, т.е. один нуклеозид связан с одним основанием ДНК. В этом случае для ЭБ рассмотрена возможность его кооперативного связывания с ДНК с фактором кооперативности ω по уравнению МакГи и фон Хиппела [14]. Для расчета равновесного состава смесей ЭБ – ДНК – 6AZC по Модели 2 используется система уравнений (3.1 – 3.5).

$$\frac{R_1}{m_1} = K_1 \times (1 - R_1 - R_2 \times n_2) \quad (3.1)$$

$$\frac{R_2}{m_2} = K_2 \times \left[\frac{1 - R_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega}} \right]^{n_2} \times \frac{\omega \times R_2^2}{\gamma} \quad (3.2)$$

$$\left(R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right)^2 = \frac{\gamma}{\omega} \left(1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right) \quad (3.3)$$

$$C_{D1} = m_1 + R_1 \times C_P \quad (3.4)$$

$$C_{D2} = m_2 + 2 \times K_D \times m_2^2 + R_2 \times C_P \quad (3.5)$$

Для каждой рассматриваемой модели взаимодействия оптимальные величины n , K и ε образующихся комплексов при связывании 6AZC с ДНК рассчитывались в программах оптимизации DALIS, COMP и DALSMOD по соответствующим уравнениям, как описано в работах [15, 16]. Соответствие каждой исследуемой модели экспериментальным данным определялось путем сравнения фактора Гамильтона Q с предельным значением фактора Гамильтона Q_{lim} , которые рассчитывались в конце итераций при каждом выходе из программ оптимизации по следующим уравнениям:

$$Q = \left\{ \left(\sum_{ij} (A_{ij}^o - A_{ij})^2 \right) / \left(\sum_{ij} (A_{ij}^o)^2 \right) \right\}^{1/2} \quad (4.1)$$

$$Q_{\text{lim}} = \left\{ \left(\sum_{ij} (e_{ij})^2 \right) / \left(\sum_{ij} (A_{ij}^0)^2 \right) \right\}^{1/2}, \quad (4.2)$$

где A_{ij}^0 и A_{ij} - наблюдаемые и вычисленные по закону Ламберта-Бера поглощения, а e_{ij} - отклонение в поглощении i -го раствора при j -ой длине волны, вычисленное с учетом ошибок во всех экспериментальных величинах.

Следуя общим выводам математической статистики для много параметрических задач, модель удовлетворяет экспериментальным данным при условии $Q < Q_{\text{lim}}$ [12]. Оптимальные значения величин мест связывания n и ω (и соответствующие им константы связывания и молярные коэффициенты экстинкции для разных типов комплексов) определялись нами как величины, при которых фактор Гамильтона Q был минимальным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки константы связывания 6AZC с ДНК, имеющей различные структурные модификации, нами были проведены эксперименты по спектрофотометрическому титрованию в трех модельных системах 6AZC — ДНК: для нативной, частично или полностью денатурированной в бессолевых водных растворах молекул ДНК. Спектры поглощения смесей 6AZC с частично расплетенной в бессолевом растворе ДНК представлены на рис. 3.

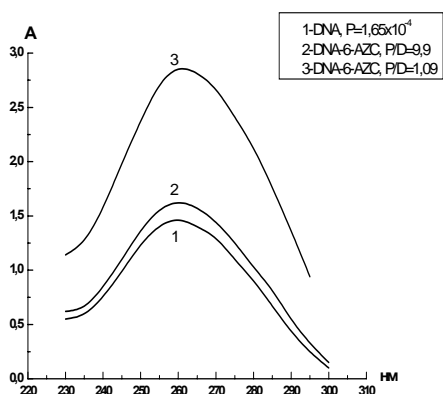


Рис.3.Спектры поглощения смесей ДНК-6AZC, для ДНК частично денатурированной в бессолевом водном растворе, а затем ренатурированной в солевом растворе ($C_{\text{NaCl}} = 6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$).

Из рис. 3 видно, что при постоянной концентрации ДНК и с ростом концентрации добавляемого 6AZC наблюдается только рост поглощения во всем интервале длин волн. Другими словами, качественный анализ спектров смесей 6AZC – ДНК не позволяет сделать вывод о возможном связывании 6AZC с ДНК. Так, с ростом концентрации

лиганда не наблюдается смещений максимумов поглощения смесей или интенсивных изменений в поглощении 6AZC, характеризующих образование комплекса. Подобные изменения в спектрах наблюдались нами и для смесей 6AZC с нативной и полностью расплетенной ДНК. Рост поглощения смесей 6AZC – ДНК при постоянной концентрации ДНК и увеличивающейся концентрации добавляемого лиганда можно объяснить возрастающим вкладом в поглощение раствора свободной ДНК и об образовании комплекса в этом случае может свидетельствовать только отклонение от аддитивности вкладов поглощений 6AZC и ДНК. Поэтому для смесей 6AZC – ДНК при расчете констант, величин мест связывания и оптимальных значений ϵ образующихся комплексов была использована программа оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей DALIS (см. Материалы и методы), позволяющая учитывать такое отклонение от аддитивности. Полученные с помощью такого подхода оптимальные величины молярных коэффициентов экстинкции соответствующих комплексов 6AZC с молекулами ДНК приведены на рис.4, а соответствующие значения констант и мест связывания - в таблице 1.

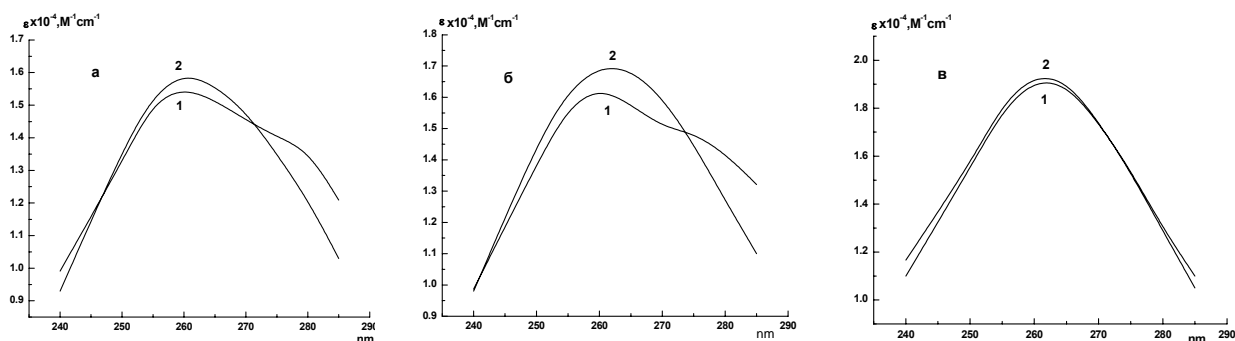


Рис.4. Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции комплексов 6AZC с ДНК для: нативной ДНК тимуса теленка (а), частично денатурированной в воде тимусной ДНК (б), полностью денатурированной в воде тимусной ДНК (в) ($C_{6AZC}=8,9 \times 10^{-5} M$). Обозначения: 1 – оптимальные значения ϵ комплексов 6AZC – ДНК, 2 – сумма молярных коэффициентов экстинкции ϵ свободных 6AZC и ДНК.

Таблица 1

Оптимальные значения констант связывания 6AZC с молекулами ДНК разной степени денатурации, рассчитанные по программе оптимизации DALIS при $n=1$, $t=22^\circ C$.

	K, M^{-1}	n	Q	Q_{lim}
6AZC – ДНК ¹⁾	5×10^2	1	0,0033	0,016
6AZC – ДНК ²⁾	2×10^3	1	0,0033	0,016
6AZC – ДНК ³⁾	9	1	0,012	0,013

¹⁾ ДНК нативная;

²⁾ ДНК, частично денатурированная в водном бессолевом растворе и затем ренатурированная в солевом растворе;

³⁾ ДНК, полностью денатурированная в водном бессолевом растворе.

Хорошо видно, что для нативной и частично денатурированной ДНК спектры комплексов ДНК - 6AZC (рис.4,а,б, кривая 1), полученные в результате оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей, отличаются от спектров, полученных путем простого сложения молярных коэффициентов экстинкции свободных ДНК и лиганда (рис.4,а,б, кривая 2). Это свидетельствует об изменении ϵ связанного 6AZC при его взаимодействии с этими образцами ДНК. Для смесей 6AZC с полностью денатурированной ДНК наблюдается практически полное совпадение расчетных ϵ комплекса с суммой молярных коэффициентов экстинкции ϵ свободных ДНК и лиганда во всем интервале длин волн (рис.4,в, кривые 1 и 2), что свидетельствует об отсутствии связывания.

Таким образом, используя один из предложенных нами подходов к анализу спектрофотометрических данных, мы смогли рассчитать и сравнить параметры связывания в системах 6AZC – ДНК для образцов нативной ДНК и ДНК с измененной путем частичной денатурации структурой. Из таблицы следует, что 6AZC лучше всего связывается с ДНК, нативная структура которой изменена, но двойная спираль сохраняется и не взаимодействует с полностью денатурированной ДНК (т.е. с ДНК с практически расплетенной двойной спиралью). Кроме того, нужно отметить, что такие,

достаточно низкие $K=5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ и $K=2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, наблюдаемые в этом случае, не характерны для констант связывания по типу интеркаляции лигандов или их размещению в бороздках ДНК. Найденная величина места связывания $n=1$ также свидетельствует о том, что способ связывания 6AZC с ДНК отличен от классической интеркаляции и что нет АТ- или ГЦ- специфичности связывания.

Рассмотрим теперь связывание 6AZC с ДНК в комплексе с классическим интеркалятором бромистым этидием. Интеркаляция предполагает встраивание плоского гетероциклического ароматического хромофора лиганда между соседними парами оснований двойной спирали ДНК. При интеркаляции различных малых молекул в ДНК расстояние между соседними парами оснований увеличивается от 3.4 \AA до $6,8 \text{ \AA}$ [17]. Интеркаляция ЭБ приводит к уменьшению нормального поворота пар (twist) с 36° до 10° , то есть происходит "раскручивание" двойной спирали на 26° [18]. Локальное раскручивание приводит к структурным изменениям всей матрицы ДНК [19].

На рис. 5, а приведены спектры поглощения смесей ЭБ – ДНК при постоянной концентрации ЭБ в широкой области концентраций ДНК ($0 \div 2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$). Видно, что не все спектры из рассмотренной области значений $P/D_{\text{ЭБ}}$ проходят через одни и те же изобестические точки ($\lambda=390 \text{ nm}$ и $\lambda=510 \text{ nm}$). Это свидетельствует об образовании в системе ЭБ – ДНК как минимум двух разных типов комплексов. При добавлении в систему ЭБ – ДНК 6AZC спектры смесей ЭБ – ДНК в том же интервале P/D меняются. Наблюдаемые различия невелики (рис. 5, б), и значительно лучше видны при сравнении концентрационных зависимостей спектров поглощения смесей ЭБ – ДНК и ЭБ – ДНК – 6AZC при одной длине волны (рис.6).

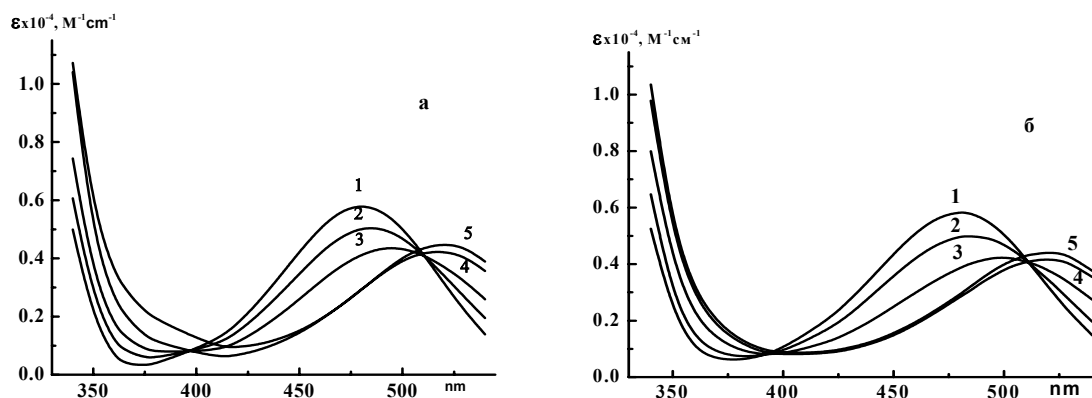


Рис. 5. Спектры поглощения смесей ЭБ – ДНК при $C_{\text{ЭБ}} = 1,15 \times 10^{-4} \text{ M}$; $P/D = 0$ (1); 1,0 (2); 2,0 (3); 5,0 (4); 21,7 (5) (а) и смесей ЭБ – ДНК – 6AZC при $C_{\text{ЭБ}} = 9,87 \times 10^{-5} \text{ M}$; $C_{6\text{AZC}} = 1,12 \times 10^{-4} \text{ M}$; $P/D = 0$ (1); 1,1 (2); 2,7 (3); 7,3 (4); 13,4 (5) (б).

Видно, что концентрационные зависимости спектров поглощения смесей ЭБ – ДНК и ЭБ – ДНК – 6AZC в $\lambda=340 \text{ nm}$ различаются (рис. 6). Так незначительные в области низких значений $P/D_{\text{ЭБ}}$, различия между этими кривыми титрования увеличиваются с ростом концентрации ДНК (рис. 6). Из этого следует, что 6AZC выступает в качестве конкурента ЭБ за места связывания на ДНК в большей степени при высоких значениях P/D , меняя концентрационные зависимости связывания ЭБ с ДНК. Используя полученные экспериментальные данные, мы смогли оценить по Модели 1 и по Модели

2 (см. Материалы и методы) параметры связывания 6AZC с ДНК, которые представлены в табл. 2.

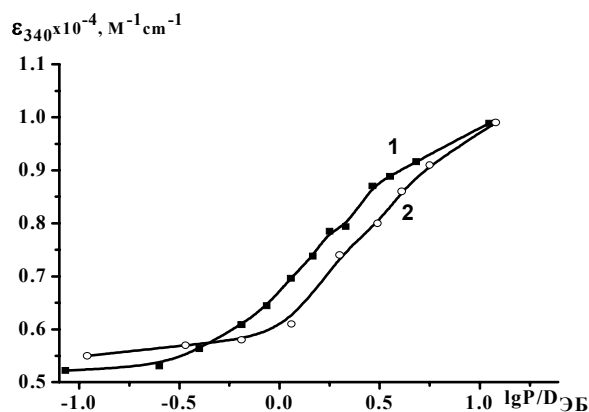


Рис. 6. Зависимость поглощения смесей ЭБ – ДНК ($C_{ЭБ} = 1,15 \times 10^{-4}$ М) (1) и смесей ЭБ – ДНК – 6AZC ($C_{ЭБ} = 7,54 \times 10^{-5}$ М; $C_{6AZC} = 6,92 \times 10^{-4}$ М) (2) от $P/D_{ЭБ}$ в $\lambda = 340$ нм.

Таблица 2.

Оптимальные значения параметров связывания нуклеозида 6AZC с нативной ДНК, рассчитанные по *Модели 1* и по *Модели 2* в присутствии ЭБ (программа оптимизации COMP и DALSMOD, соответственно).

	6AZC ¹	6AZC ²
K_1, M^{-1}	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
n_1	$1,1 \pm 0,1$	1,0
Q	0,027	0,027
Q_{lim}	0,031	0,036

¹⁾ параметры связывания 6AZC с ДНК, рассчитанные по *Модели 1*,

²⁾ параметры связывания 6AZC с ДНК, рассчитанные по *Модели 2*.

Как видно из таблицы 2, обе модели позволяют достаточно хорошо описывать спектральные изменения, происходящие в системах 6AZC – ДНК – ЭБ, поскольку $Q < Q_{lim}$. Также видно, что величины констант связывания 6AZC с ДНК, рассчитанные по двум разным моделям, практически совпадают. Найденная оптимальная величина места связывания $n=1$ для нативной тимусной ДНК в присутствии ЭБ совпадает с рассчитанной нами ранее величиной для связывания 6AZC с ДНК при разных степенях ее повреждения, что также опровергает возможность интеркаляции 6AZC. Однако константа связывания 6AZC с ДНК в присутствии ЭБ на порядок превышает величину константы с частично денатурированной ДНК, и на два порядка с нативной.

ВЫВОДЫ

Таким образом, необходимо отметить, что наши подходы к анализу спектрофотометрических концентрационных зависимостей могут использоваться для расчета параметров связывания в системах лиганд – ДНК, в тех случаях, когда полоса поглощения лиганда лежит в той же области, что и полоса поглощения ДНК. С помощью этих подходов мы смогли рассчитать величины констант и мест связывания нуклеозида 6AZC с ДНК, находящейся в различных структурных модификациях,

вызванных денатурацией и присутствием ЭБ. Показано, что не только 6AZC влияет на связывание ЭБ с ДНК, но существует и обратный эффект – в присутствии ЭБ 6AZC связывается с нативной ДНК с большей константой. Наиболее предпочтительным объяснением такого поведения при связывании 6AZC с ДНК может оказаться то, что вторичная структура ДНК была изменена в следствие интеркаляции ЭБ. Стехиометрия связывания нуклеозида остается постоянной для всех систем 6AZC с ДНК ($n=1$), т.е. ЭБ не конкурирует непосредственно за места связывания с 6AZC, а рост константы комплексообразования говорит только о том, что изменения структуры матрицы позволяют молекуле 6AZC увеличить активность связывания с ДНК. По-видимому, увеличение связывания 6AZC с модельными образцами ДНК также произошло из-за нарушения ее нативной вторичной структуры, но такие изменения менее выгодны с точки зрения возможности встраивания нуклеозида. Однако мы не исключаем того, что такие отличия в полученных величинах констант связывания 6AZC с различными структурами ДНК могут быть связаны и с недостатками предложенных нами моделей для анализа конкурентного связывания. По данным различных авторов [20-22] ЭБ может образовывать на матрице ДНК несколько типов комплексов. Эти типы комплексов спектрально слабо различимы, однако имеют отличающиеся параметры связывания (n, K).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пальчиковська Л. Г., Гарманчук Л.В., Алексеева І.В. и др. N1-глікозидні аналоги 6-азацитидину. II. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію *in vitro* // Біополімери і клітина. – 2005. – Т. 21. – № 5. – С. 432 – 438.
2. Носач Л.М., Дяченко Н.С., Шаламай А.С., Алексеева И. Н., Кушко Л.Я., Озвинчук И.И., Жовноватая В.Л., Бутенко С.И., Петровская И.А., Дранник Г.Н. Антиаденовирусное и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина // Биополимеры и клетка. – 1996. – Т.12. № 1. – С. 75 – 85.
3. 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 // Біополімери і клітина. – 2004. – Т. 20. № 4. – С. 337 – 342.
4. С.В. Галушко, З.П. Булкина, Н.А. Петруша, И.П. Шишкина. Фармакокинетика 6-азацитидина // Химико-фармацевт. Журн. – 1986. – Т. 20. № 11. – С. 1302 – 1305.
5. Samijlenko S.P., Alexeeva I.V., Palchykiv's'ka L.H. и др. ^1H NMR investigation on 6-azacytidine and its derivatives // Spectrochimica Acta Part A. – 1999. – V.55. – P. 1133 – 1141.
6. Пальчиковська Л.Г., Платонов М.О., Алексеева И.В. Механізм взаємодії N-1 глікозидів 6-азацитозину з каталітичним сайтом ДНК-залежної РНК полімерази фагу T7: модельне неемпіричне квантово-хімічне дослідження // Біополімери і клітина. – 2005. – Т. 21. № 6. – С. 561 – 563.
7. Genotoxicity of not directly DNA damaging compounds // <http://default/centreformolec/ejgt/stopper.doc>.
8. Круглова Е.Б. Спектрофотометрический анализ поведения растворов ДНК в воде и при низких ионных силах // Биополимеры и клетка. – 1992. – Т. 8. №.1 – С. 56 – 62.
9. E.B.Kruglova, N.A.Gladkovskaya. Comparison of the binding of the therapeutically active nucleosides to DNA molecules with different level of lesions // The International Society for Optical Engineering. Proceedings of SPIE. - 2002. - V 4938. - P. 241 – 245.
10. Bresloff J.L., Crothers D.M. DNA-ethidium reaction kinetics: demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites // J. Mol. Biol. – 1975. – V.95. – P. 103 – 123.
11. Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Tarzikian G.A., Frank-Kamenetskii M.D. Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: the effect to two types of interaction of ligand on the parameters of transition // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1990. – V. 8(1). – P. 123-30.
12. Hartley F., Burgess C., Alcock R. Solution equilibria. - Ellis Horwood. - 1980. - 360 p.
13. Iermak Ie.L., Kruglova O.B., Palchykovska L.H., Alexeeva I.V. Spectrophotometrical study of mechanisms of binding of cytidine analogues and ethidium bromide with DNA // Biopolymers and cell. – 2007. – V. 23. № 6. – P.529 – 536.

14. McGhee J.D., von Hippel P.H. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice// *J. Mol. Biol.*- 1974. – V. 86. - P. 469-489.
15. Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская, В.Я. Малеев Использование метода спектрофотометрического анализа для вычисления термодинамических параметров связывания в системах актиноциновые производные – ДНК// *Биофизика.* -2005. – Т. 50. - В.2. - С. 253-264
16. Круглова Е.Б., Ермак Е.Л. Конкурентное связывание двух лигандов: актиноцинового производного и кофеина с полирибозитидиловой кислотой в разных конформационных состояниях// *Вісн. ХНУ.* - № 637. *Біофіз. Вісн.* – 2004. -№ 1-2 (14). - С.32-38.
17. Di Marco A., Arcamone F. DNA complexing antibiotics: daunomycin, adriamycin and their derivatives//*Arzneimittelforschung. (Drug Res.)*. – 1975.- V. 25(3). – P. 368-374.
18. Vologodskii A. Exploiting circular DNA// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1998.- Vol. 95. - P. 4092–4093.
19. Graves D. E., Velea L. M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids// *Curr. Org. Chem.*- 2000. -V. 4. – P. 915 - 929.
20. Winkle S.A., Rosenberg L.S., Krugh T.R. On the cooperative and noncooperative binding of ethidium to DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1982. – V. 10. – P. 8211 – 8223.
21. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. Complex-formation of ethidium bromide with poly[d(A-T)*poly[d(A-T)] // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2005. – V. 22. – P. 465 – 470.
22. Fox K.R., Michael J., Waring M.J. Footprinting at low temperatures: evidence that ethidium and other simple intercalators can discriminate between different nucleotide sequences // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – V. 15. – P. 491–507.