

Физика

УДК 577.3

В. И. ВАРДАНЯН

О ДВУХ ТИПАХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ РАЗДЕЛЕНИЮ НИТЕЙ ДНК ПРИ РАЗРУШЕНИИ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

Показано, что помимо противоопухолевых препаратов, образующих межпочечные сшивки, разделению нитей ДНК могут препятствовать также соединения, вызывающие сильную локальную стабилизацию двойной спирали. Примерами таких соединений, приведенными в данной работе, являются комплексы платины и рутения. Предложен способ определения механизма запрещения разделения цепей ДНК противоопухолевыми препаратами и другими соединениями, основанный на сопоставлении результатов компьютерного моделирования и экспериментальных данных по плавлению комплексов ДНК.

Введение. Многие противоопухолевые препараты реализуют свою биологическую активность путем ковалентного сшивания нитей ДНК [1]. Сшивки, препятствуя расхождению нитей ДНК, останавливают деление клеток, однако, как правило, не препятствуют полному плавлению всех пар оснований при повышении температуры. Более того, как показывают результаты рентгеноструктурного анализа и ЯМР, они обычно вызывают локальное нарушение двойной спирали ДНК [2–5].

Известно, что стабильность коротких ДНК быстро растет с увеличением их концентрации и длины цепи. Для длинных цепей концентрационная зависимость сохраняется, но ослабеваает. Наши расчеты показали, что после межпочечного сшивания температура плавления ДНК перестает зависеть от ее концентрации, но продолжает зависеть от длины цепи. Однако у сшитых ДНК эта зависимость слабее, чем у немодифицированных ДНК.

Чтобы исследовать влияние сшивок на диссоциацию нитей ДНК и процесс плавления в целом, нами была разработана теория плавления сшитых ДНК [6]. Особое внимание было уделено диссоциации цепей после полного плавления в высокотемпературной области. С помощью этой теории рассчитывались температурные зависимости доли расплавленных пар оснований (кривая плавления) и доли полностью расплавленных (диссоциированных) молекул ДНК (кривая диссоциации).

Модель и результаты расчетов. Для этого исследования введем понятие идеальной сшивки. Реальная межцепочечная сшивка, помимо соединения цепей ДНК, может изменить стабильность сшитых и расположенных рядом с ними пар оснований [2], а также энергию границы между спиральными и расплавленными участками, если граница локализована в области расположения сшивки. Идеальные сшивки вызывают только эффект сшивания. В результате при расчетах удастся получить влияние на плавление ДНК самого эффекта сшивания без искажений, которые всегда присутствуют в реальных экспериментах.

Расчеты показали, что идеальные сшивки стабилизируют (повышают) температуру плавления ДНК. В случае коротких цепей повышение происходит в результате превращения реакции плавления из бимолекулярной в мономолекулярную из-за подавления разделения цепей. В итоге температура плавления перестает зависеть от концентрации ДНК. Для длинных цепей увеличение температуры плавления происходит в результате уменьшения энтропии расплавленных участков в частично и полностью расплавленных ДНК.

При сшивании изменяются многие свойства двойной спирали. Так, расчеты показывают, что немодифицированный случайный АТ-полимер плавится с концов цепи, не образуя внутренних расплавленных петель. Однако две межцепочечные сшивки, расположенные на концах цепи длиной в 5000 пар оснований, вызывают формирование внутренних расплавленных участков (петель) в процессе плавления.

До последнего времени предполагалось, что только ковалентное сшивание нитей ДНК способно предотвратить их разделение. Можно было предположить, что любая из трех модификаций ДНК (см. рис. 1) при применении противоопухолевых соединений платины может дать подобный и даже более сильный эффект, если в точках химической модификации происходит очень сильное увеличение стабильности двойной спирали. В этих точках двойная спираль сохраняется в условиях, вызывающих полное разделение

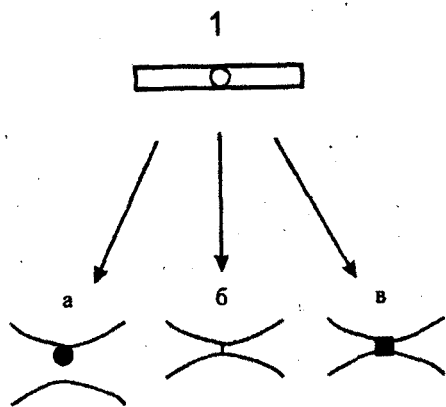


Рис. 1. Химически модифицированная молекула ДНК (1) и ее состояние в условиях полного разделения нитей немодифицированной ДНК: а – монофункциональный аддукт отдельных нуклеотидов или внутрицепочечная сшивка нуклеотидов одной цепи; б – межцепочечная сшивка двух нуклеотидов различных цепей; в – сильная локальная стабилизация двойной спирали.

нитей на остальных участках ДНК (рис. 1, в). Отсюда следует, что даже нековалентное необратимое связывание с ДНК может дать такой эффект при достаточно сильной локальной стабилизации коротких участков двойной спирали.

Путем математического моделирования термодинамических свойств таких систем при помощи уравнений, полученных в работе [6], мы показали, что сильная стабилизация химически модифицированной пары оснований

молекулы ДНК вызывает образование вокруг нее двух протяженных спиральных участков, состоящих из обычных немодифицированных АТ- и GC-пар. Весь этот протяженный спиральный участок предотвращает разделение нитей в условиях полной диссоциации немодифицированной макромолекулы. Полное плавление этих немодифицированных пар возможно только при бесконечном повышении температуры. Длину этих участков (n) можно выразить простой приближенной формулой, которая справедлива при температуре, превышающей температуру плавления немодифицированной ДНК более чем на ширину температурного интервала перехода спираль-клубок:

$$n = s/(1-s), \quad (1)$$

$$s = \exp[\Delta S(T_m - T)/(RT)],$$

где ΔS – изменение энтропии пары оснований при переходе спираль-клубок, T_m – температура плавления бесконечно длинной ДНК, не содержащей химических модификаций, T – температура плавления химически модифицированной ДНК, R – универсальная газовая постоянная.

Разработанный нами метод показал, что минимальная энергия стабилизации, необходимая для предотвращения диссоциации нитей ДНК в молекулах, содержащих различное число точек сильной локальной стабилизации, должна превышать 25 ккал на один моль модификации. На рис. 2 представлены расчетные зависимости изменения температуры плавления от относительного содержания модификаций для сильной локальной стабилизации (I) и межцепочечного сшивания (II). Из рисунка видно, что локальная стабилизация вызывает очень сильное увеличение общей стабильности двойной спирали (температуры плавления ДНК), если имеется более одной модификации на 100 пар оснований ДНК. Межцепочечное сшивание ДНК вызывает значительно меньшее увеличение температуры плавления. Сопоставление экспериментальных данных (точки) [7–9] для противоопухолевых соединений 1–4 (рис. 2) с расчетными кривыми показывает, что все эти соединения повышают температуру плавления на величину, предсказанную теорией для мест сильной локальной стабилизации и предотвращают разделение нитей ДНК. То есть, процесс проходит по

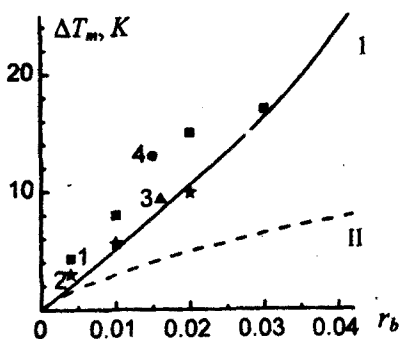


Рис. 2. Теоретические зависимости изменения температуры плавления ДНК от относительной концентрации (на нуклеотид) мест сильной локальной стабилизации (I), в которых сохраняются участки двойной спирали при диссоциации остальной макромолекулы ДНК, и межцепочечных сшивков (II). Точки – экспериментальные данные для соединений 1–4:

1. $[\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]^{2+}$ ($n=4$);
2. $[\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2]^{2+}$ ($n=6$);
3. $[\text{transPtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]^{2+}$;
4. $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$.

указанному нами механизму. Кривую I (рис. 2), полученную для мест сильной локальной стабилизации, можно использовать как критерий, позволяющий установить молекулярный механизм действия противоопухолевых металлокомплексов (а также других потенциальных противоопухолевых соединений). Можно определить, является ли то или иное соединение сшиваю-

щим агентом, который предотвращает разделение нитей ДНК, но не препятствует разрушению двойной спирали в точке модификации, или рассматриваемое соединение вызывает сильную локальную стабилизацию, которая не только предотвращает разделение нитей ДНК, но и препятствуют разрушению двойной спирали.

Отбор соединений, образующих межцепочечные сшивки или места сильной локальной стабилизации, можно проводить на основании их способности восстанавливать двойную спираль ДНК после нагревания растворов до температур, значительно превышающих температуру плавления ДНК, и дальнейшего охлаждения. Если изучаемое соединение не вызывает практически полного восстановления двойной спирали, это означает, что оно не формирует ни межцепочечных сшивок, ни мест сильной локальной стабилизации. Если соединение вызывает восстановление двойной спирали, а температура плавления оказывается ниже, чем на кривой I для одной и той же отн. концентрации, то оно формирует межцепочечные сшивки. Если же точки окажутся выше кривой, то данное соединение вызывает формирование мест сильной локальной стабилизации.

Таким образом, разработанный метод выявления мест сильной локальной стабилизации позволяет провести исследование уже известных противоопухолевых металлокомплексов, установить их эффективность, а также выявить новые соединения, реализующие свою биологическую активность через необратимое связывание с ДНК.

Автор выражает благодарность профессору Д.Ю. Ландо за помощь, оказанную при выполнении данной работы.

Работа поддержана фондом МНТЦ (грант А301.2).

Кафедра молекулярной физики

Поступила 23.05.2006

ЛИТЕРАТУРА

1. Kohn K.W. – Cancer Research, 1996, v. 56, p. 5533–5546.
2. Hofr C., Brabec V. – J. Biol. Chem., 2001, v. 276, p. 9655–9651.
3. Takahara P.M., Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard S.J. – Nature, 1995, v. 377, p. 649–652.
4. Van Boom S.S.G.E., Yang D., Reedijk J., Van der Marel G.A., Wang A.H.-J. – J. Biomol. Struct. Dynam., 1996, v. 13, p. 989–998.
5. Breslauer K.J. – Methods in Enzymology, 1995, v. 258, p. 221–242.
6. Dalyan Y.B., Fridman A.S., Lando D.Y., Vardanyan V.I. – Proceedings of the International Conference on unification and optimization of radiation monitoring on NPP location regions. Yerevan, 2004, p. 30–39.
7. Farrell N., Qu Y., Feng L., Van Houten B. – Biochemistry, 1990, v. 29, p. 9522–9531.
8. Grover N., Welch T.W., Fairley T.A., Cory M., Thorp H.H. – Inorg. Chem., 1994, v. 33, p. 3544–3548.
9. Kasparkova J., Novakova O., Vrana O., Farrell N., Brabec V. – Biochemistry, 1999, v. 38, p. 10997–11005.

ԿՐԿՆԱԿԻ ՊԱՐՈՒՅՐԻ ԶԱՅԶԱՅՄԱՆ ԴԵՊՐՈՒՄ ԴՆԹ-Ի ԸՂԹԱՆԵՐԻ
ԲԱԺԱՆՄԱՆԸ ԽՈՉԸՆԴՈՏՈՂ ԵՐԿՈՒ ՏԻՊԻ ՀԱԿԱՌՈՒՈՒՑՔԱՅԻՆ
ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ամփոփում

Ցույց է տրված, որ բացի միջշրթայական կցակարում առաջացնող հակաուռուցքային միացություններից, ԴՆԹ-ի շրթաների բաժանմանը կարող են խոչընդոտել նաև որոշ միացություններ, որոնք առաջացնում են պարույրի ուժեղ տեղային կայունացում: Այդպիսի միացությունների օրինակ են հանդիսանում աշխատանքում քննարկված պլատինային և ռութենիումային միացությունները: Առաջարկված է եղանակ, որը թույլ է տալիս պարզաբանել հակաուռուցքային և այլ միացություններով պայմանավորված ԴՆԹ-ի շրթաների բաժանումը կանխարգելող մեխանիզմները: Այդ եղանակը հիմնված է ԴՆԹ-ի կոմպլեքսների հարման համակարգչային մոդելավորման արդյունքների և փորձարարական տվյալների համադրման վրա:

V. I. VARDANYAN

ON THE TWO TYPES OF ANTITUMOR COMPOUNDS PROHIBITING
STRAND SEPARATION UNDER THE DOUBLE HELIX DAMAGE

Summary

It is shown that, besides antitumor drugs that form interstrand crosslink, DNA strand separation can be prohibited by compounds that induce a strong local stabilization of the double helix. Ruthenium and platinum complexes, examples of such compounds, are revealed in this work. A method of determination of concrete binding mechanism is proposed. The method is based upon comparison of results of computer modeling with experimental data on melting of DNA complexes with compounds under consideration.