

УДК 541(64+49):546.92

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЫ ДНК С КООРДИНАЦИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ

© 2003 г. Н. А. Касьяненко*, С. С. Абрамчук**, И. В. Благодатских**,
А. А. Богданов*, М. О. Галлямов***, А. И. Кононов*, Ю. В. Космотынская*,
Н. Л. Ситникова**, А. Р. Хохлов**

* Санкт-Петербургский государственный университет.
Физический факультет

198504 Санкт-Петербург, Петродворец, Ульяновская ул., 1

** Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова
Российской академии наук

119991 Москва, ул. Вавилова, 28

*** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.
Физический факультет

119992 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 05.11.2002 г.

Принята в печать 26.05.2003 г.

Методами низкоградиентной вискозиметрии, спектрофотометрии, люминесценции, динамического светорассеяния, флуоресцентной и атомно-силовой микроскопии изучены комплексы ДНК с *цис*-дихлородиаминплатиной и *транс*-дихлородиаминплатиной. Обнаружено уменьшение размеров молекулы ДНК при ее взаимодействии с координационными соединениями платины. Образование комплексов ДНК с *цис*-дихлородиаминплатиной приводит к уменьшению интенсивности люминесценции и константы связывания бромистого этидия с ДНК. Влияние *транс*-дихлородиаминплатины на эти параметры несколько меньше.

ВВЕДЕНИЕ

Цис-дихлородиаминплатина (*цис*-ДДП) является противоопухолевым препаратом, который активно используется в медицинской практике около тридцати лет. При лечении ряда опухолей *цис*-ДДП демонстрирует высокую эффективность, хотя применение этого препарата ограничивает его токсичность и неизбирательность действия [1–4]. В настоящее время поиск активных и нетоксичных аналогов *цис*-ДДП среди координационных соединений представляет собой весьма актуальную задачу [5, 6]. Установлено, что основной мишенью для *цис*-ДДП в клетке является молекула ДНК [7]. В связи с этим сравнительное исследование молекулярного механизма действия *цис*-ДДП и ее аналогов на уровне модельных систем (разбавленных растворов ДНК) представляет значительный интерес для первоначального отбора новых препаратов. *Транс*-изомер дихлородиаминплатины (*транс*-ДДП), отличающийся от *цис*-ДДП только расположением лигандов в ко-

ординационной сфере металла, не проявляет противоопухолевой активности. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с *цис*- и *транс*-ДДП активно продолжается до настоящего времени [8–10]. Несмотря на значительный экспериментальный материал, полученный при исследовании взаимодействия молекулы ДНК с этими соединениями платины, остается еще ряд нерешенных вопросов. В первую очередь не вполне ясно, какие именно конформационные изменения молекулы ДНК, сопровождающие образование ее комплексов с *цис*- и *транс*-ДДП, ответственны за противоопухолевую активность этого препарата. В настоящее время установлено, что конечным продуктом действия *цис*-ДДП в клетке является образование координационной связи платины с азотистыми основаниями ДНК (наиболее часто рассматривается связь платины с атомом N7 гуанина). Существует мнение, что связывание *цис*-ДДП с ДНК индуцирует изгиб ее спирали [10, 11]. Расширение круга методов исследования комплексов ДНК с координационными соединениями

E-mail: kasyan@paloma.spbu.ru (Касьяненко Нина Анатольевна).

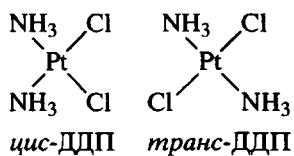
платины может дать более определенную информацию о механизме их взаимодействия.

В настоящей работе изучена конформация молекулы ДНК в комплексах с *цис*-ДДП и ее неактивным *транс*-аналогом методами флуоресцентной и атомно-силовой микроскопии (АСМ), динамического рассеяния света, низкоградиентной вискозиметрии, спектрофотометрии и люминесценции.

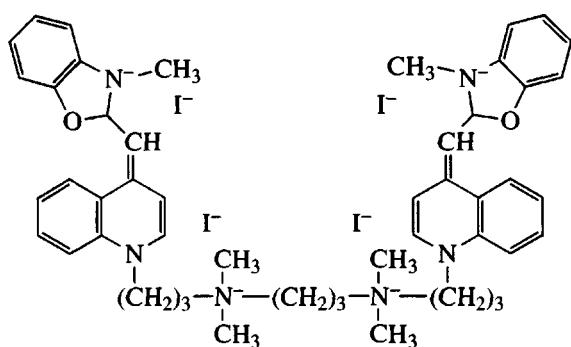
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества

В работе использовали тимусную ДНК фирмы "Serva" (9000 пар оснований), молекулярную массу которой рассчитывали по значению характеристической вязкости в 0.15 M NaCl, и ДНК фага T4 фирмы "Sigma" (166000 пар оснований). Концентрацию и нативность ДНК в растворе определяли спектрофотометрически по методу Спиринга [12]. Соединения платины



были синтезированы и охарактеризованы в Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии. Использовали соли металлов квалификации х.ч., бромистый этидий фирмы "Sigma", краситель оксазол желтый (Yo-Yo) фирмы "Molecular Probes, Inc."



Атомно-силовая микроскопия

Измерения проводили на приборе NanoScope IIIa ("Digital Instruments", USA) в режимах постоянного и прерывистого контакта. АСМ-изображения записывали с частотой строчной разверт-

ки 1–5 Гц и плотностью информации 512×512 точек. Для приготовления образцов использовали выдержаные в течение 1 суток при температуре 4°C растворы ДНК с соединениями платины ($c_{\text{ДНК}} = 5 \times 10^{-6}$ моль/л (в парах оснований), $c_{\text{Pt}} = 5 \times 10^{-5}$ моль/л). Непосредственно перед фиксацией ДНК на поверхности слюдяной подложки исходный раствор разбавляли в 10 раз с добавлением MgCl₂ (конечная концентрация MgCl₂ в растворе составляла 0.001 моль/л). После нанесения на подложку капли препарата приготовленный образец высушивали на воздухе. Все измерения проводили при комнатной температуре на воздухе. Для обработки и построения полученных изображений использовали программное обеспечение FemtoScan Online 1.6 (Центр перспективных технологий, Россия).

Флуоресцентная микроскопия

Изображение клубков ДНК, фиксируемое с помощью флуоресценции связавшихся с ними молекул Yo-Yo, наблюдали на микроскопе "AxioLab" фирмы Carl Zeiss, Jena, оборудованном 100-кратным иммерсионным объективом и высокочувствительной CCD видеокамерой LCL-902HS компании "Watec" (чувствительность 0.00015 люкс). Полученные данные записывали на жесткий диск компьютера с частотой 10 кадров в секунду.

При приготовлении изучаемых систем в растворы ДНК с соединениями платины добавляли краситель Yo-Yo. В исследуемом растворе концентрация ДНК T4 составляла 2.3×10^{-7} моль/л (в парах оснований), а отношение концентраций красителя и ДНК (в молях пар оснований) $r_{\text{K(Yo-Yo)}} = 0.1$. Перед исследованиями раствор выдерживали в течение 1 суток при 4°C. Каплю образца объемом (5–10) $\times 10^{-9}$ м³ наносили на приборное стекло. Использовали фильтры Zeiss (Filter set 09 487909–0000). Образец облучали ртутной лампой. Для построения функции распределения клубков по размерам фиксировали максимальный размер пятна как большую ось молекулярного эллипсоида (исходя из модели эллипсоида вращения). Все измерения проводили при комнатной температуре.

Динамическое рассеяние света

Использовали тимусную ДНК (9000 пар оснований). Концентрация соединений платины в ис-

следуемых растворах составляла 5×10^{-5} моль/л, $c_{\text{ДНК}} = 0.008\%$ в 0.005 М NaCl. Растворы обесспечивали фильтрованием через мембранные Durapore с диаметром пор 65×10^{-8} м (“Millipore”).

Эксперименты выполнены на установке PhotoCor-SP (PhotoCor, Россия) с линейным 16-ти битовым коррелятором и Не-Не-лазером Uniphase 1135Р с длиной волны излучения 632×10^{-9} м и мощностью 1×10^{-2} Вт. Диапазон углов наблюдения составлял 30° – 90° , температура исследуемых растворов 25°C . Определяли гомодинную корреляционную функцию интенсивности $G^{(2)}(t)$. Измерения под каждым углом проводили с тремя различными временами запаздывания и сшивали полученные функции по методике, описанной в работах [13, 14].

Считая движения частиц независимыми, с точностью до членов порядка $1/N$ (N – число рассеивателей), можно воспользоваться соотношением Зигерта

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta |g^{(1)}(t)|^2,$$

где $g^{(2)}(t) = G^{(2)}(t)/G^{(2)}(\infty)$ – нормированная корреляционная функция рассеяния, $G^{(2)}(\infty)$ – экспериментально определяемая базовая линия, β – фактор когерентности, $g^{(1)}(t)$ – нормированная автокорреляционная функция поля.

В разбавленных растворах монодисперсных частиц при условии $q\langle R^2 \rangle^{1/2} \ll 1$ ($q = (4\pi/\lambda)\sin(\vartheta/2)$, ϑ – угол рассеяния, $\langle R^2 \rangle^{1/2}$ – среднеквадратичный радиус инерции) автокорреляционная функция поля связана с поступательной диффузией частицы (макромолекулы):

$$g^{(1)}(t) = \exp(-t/\tau) = \exp(-\Gamma t) = \exp(-Dq^2 t)$$

$$D = \lim_{q \rightarrow 0} (\Gamma/q^2)$$

Здесь τ – время релаксации рассматриваемого релаксационного процесса, D – коэффициент поступательной диффузии, скорость релаксации $\Gamma = 1/\tau$. Если в системе имеется набор независимых релаксационных процессов, то автокорреляционная функция поля является взвешенной суммой инди-

видуальных вкладов. Для непрерывного распределения

$$g^{(1)}(t) = \int_0^{\infty} A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau, \quad (1)$$

где $A(\tau)$ – функция распределения по τ интенсивности рассеянного света.

Для растворов ДНК и ее комплексов с *цис*- и *транс*-ДДП, измеренных под углом 90° , методом обратного преобразования Лапласа при наложении условия неотрицательности решения получены спектры времен релаксации, состоящие из двух разделенных полос. Обработка с помощью модели двух мод по формуле

$$G^{(2)}(t) = y_0 + (A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2))^2$$

привела к согласующимся результатам, поэтому в дальнейшем для всех случаев была использована эта модель. Значения коэффициента диффузии, определенные из быстрой релаксационной моды, экстраполировали к нулевому углу.

Спектральные исследования

Спектры поглощения растворов регистрировали с помощью спектрофотометра “Specord UV-VIS”. Спектры люминесценции получали на спектрофлуориметре “Hitachi 850”. При исследовании комплексообразования ДНК с бромистым этидием длина волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}} = 500 \times 10^{-9}$ м, а длина волны регистрации $\lambda_{\text{пер}} = 610 \times 10^{-9}$ м. Использовали диапазон отношения концентраций бромистого этидия и соединений платины к концентрации ДНК (выраженной в молях пар оснований) $c_{\text{EtBr}}/c_{\text{ДНК}} = r_{\text{EtBr}} = (0.01–0.4)$ и $c_{\text{Pt}}/c_{\text{ДНК}} = r_{\text{Pt}} = (0.2–0.8)$ соответственно.

Низкоградиентная вискозиметрия

Относительные вязкости η_r растворов ДНК изменили с помощью низкоградиентного ротационного вискозиметра типа Зимма–Крозерса при $21.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Величина характеристической вязкости ДНК, определяемая путем экстраполяции концентрационной зависимости приведенной вязкости $(\eta_r - 1)/c$ к нулевой концентрации ДНК, связа-

на с конформационными параметрами макромолекулы соотношением Флори

$$[\eta] = \Phi_0 \frac{(\bar{h}_0^2)^{3/2}}{M} \alpha^3,$$

где M – молекулярная масса ДНК; Φ – параметр Флори, зависящий от качества растворителя и жесткости макромолекул [15, 16]; коэффициент линейного набухания макромолекулы, равный отношению среднеквадратичных расстояний между концами реальной и идеальной молекулы

$$\alpha = \left(\frac{\bar{h}^2}{\bar{h}_0^2} \right)^{1/2}. \text{ Диапазон используемых градиентов}$$

скорости составлял $g \equiv (0.5-2) \text{ c}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 представлены результаты исследования изучаемых систем методом АСМ. Образцы готовили путем высушивания на слюдяной подложке капли раствора ДНК (ДНК с *цис*-ДДП или ДНК с *транс*-ДДП, растворы предварительно выдерживали 1 сутки при 4°C для образования координационной связи соединений платины с ДНК [17]). В растворы перед фиксацией добавляли 0.001 моль/л MgCl₂. Как было показано ранее [18], Mg²⁺ связывается с молекулой ДНК по фосфатным группам. Введение ионов магния после образования координационной связи соединений платины с ДНК не может повлиять на структуру комплекса [19], но способствует фиксации молекул на подложке для проведения АСМ-эксперимента [20].

Из рис. 1 видно, что фиксация ДНК описанным выше способом приводит к вытягиванию макромолекулы, хотя в растворе она имеет конформацию клубка с персистентной длиной $50 \times 10^{-9} \text{ м}$. Измерение длины макромолекулы дает величину $L = (4 \pm 1) \times 10^{-6} \text{ м}$ (для полностью вытянутой молекулы). Заметим, что расчетное значение $L = (3.0 \pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ м}$ для макромолекулы данной ММ, содержащей 9 000 пар оснований, указывает на то, что на АСМ-изображениях (рис. 1) мы, скорее всего, видим одиночные макромолекулы. При исследовании изображений комплексов ДНК с *цис*- и *транс*-ДДП были получены результаты, которые свидетельствуют об уменьшении размеров молекулы ДНК, что согласуется с полу-

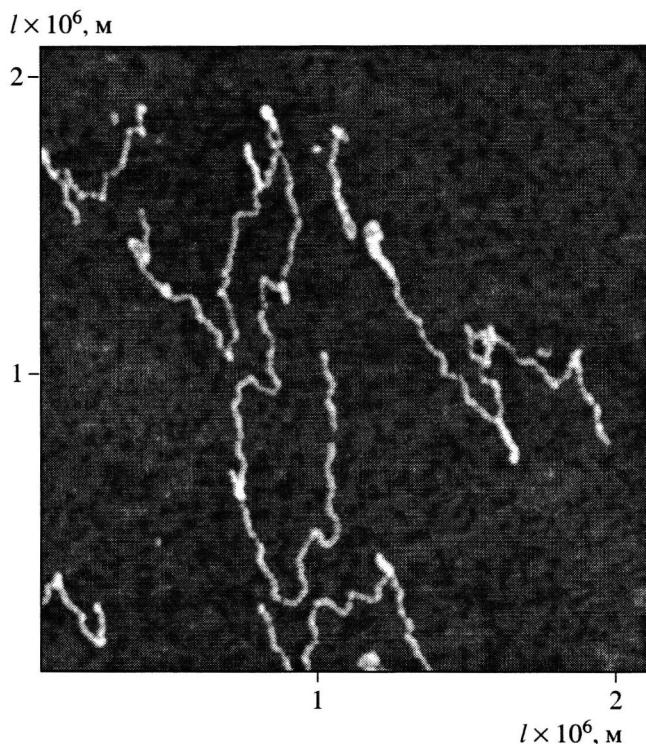


Рис. 1. Изображение тимусной ДНК (9000 пар оснований), полученное методом АСМ в режиме прерывистого контакта.

ченными ранее данными об уменьшении приведенного объема макромолекулы в комплексе с *цис*- и *транс*-ДДП [21].

Из рис. 2а и 2б, на которых представлено изображение комплексов ДНК с *цис*-ДДП, видно, что при комплексообразовании наблюдается тенденция к появлению "изломов" ДНК. Заметим, что появление изгибов двойной спирали ДНК в сторону большой бороздки при связывании с *цис*-ДДП отмечали в ряде работ ранее [22–25]. Такие конформационные изменения ДНК при связывании с *цис*-ДДП хорошо согласуются с данными других методов [26–30]. АСМ-изображение комплексов ДНК с *транс*-ДДП, указывающее на внутри- или межмолекулярную агрегацию ДНК с образованием вытянутых структур, приведено на рис. 2в. Действительно, нити ДНК на рис. 2в намного короче, чем на рис. 1. Кроме того, видны межмолекулярные сшивки, которые, по-видимому, образует *транс*-ДДП с разными молекулами ДНК. Согласно структуре этого соединения, уходящие атомы хлора, ответственные за образование координационных связей с молекулой ДНК, расположены таким образом, что в отличие от

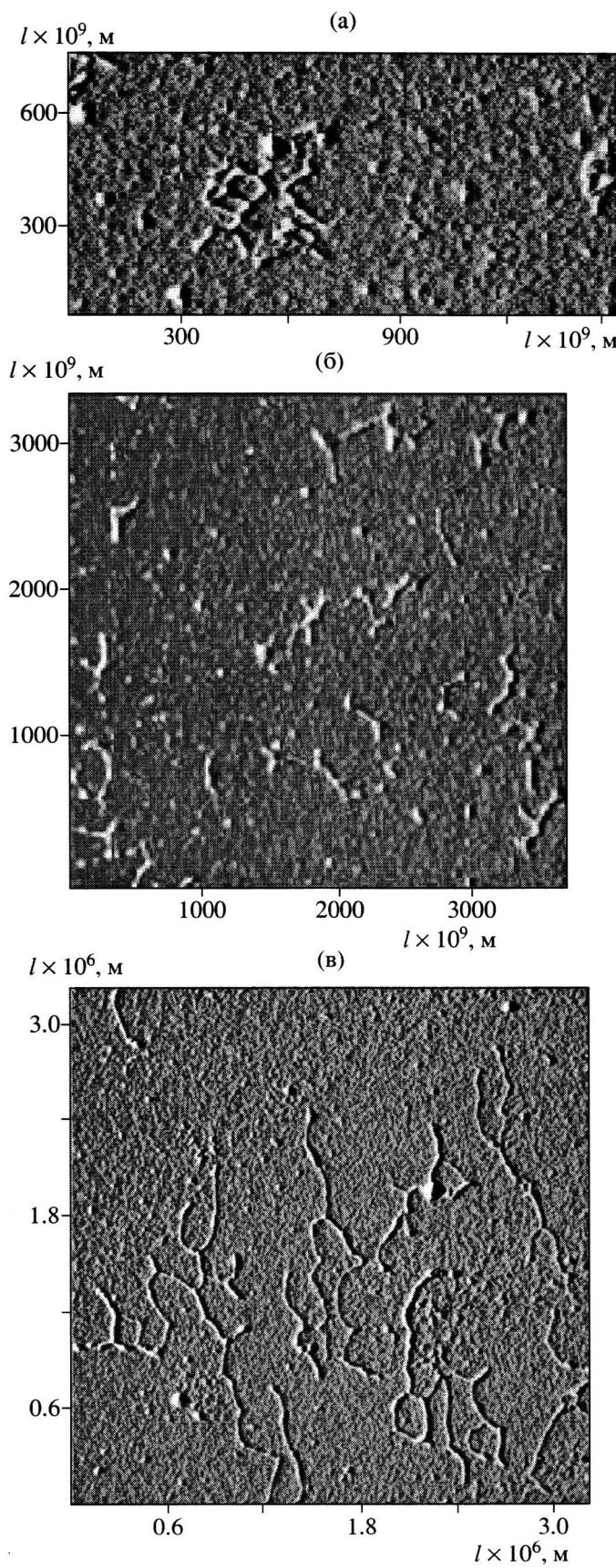


Рис. 2. Комплексы ДНК с *цис*-ДДП (а, б) и *транс*-ДДП (в). Изображение получено в режиме прямого сканирования (а, б) и в режиме прерывистого контакта (в). Пояснения в тексте.

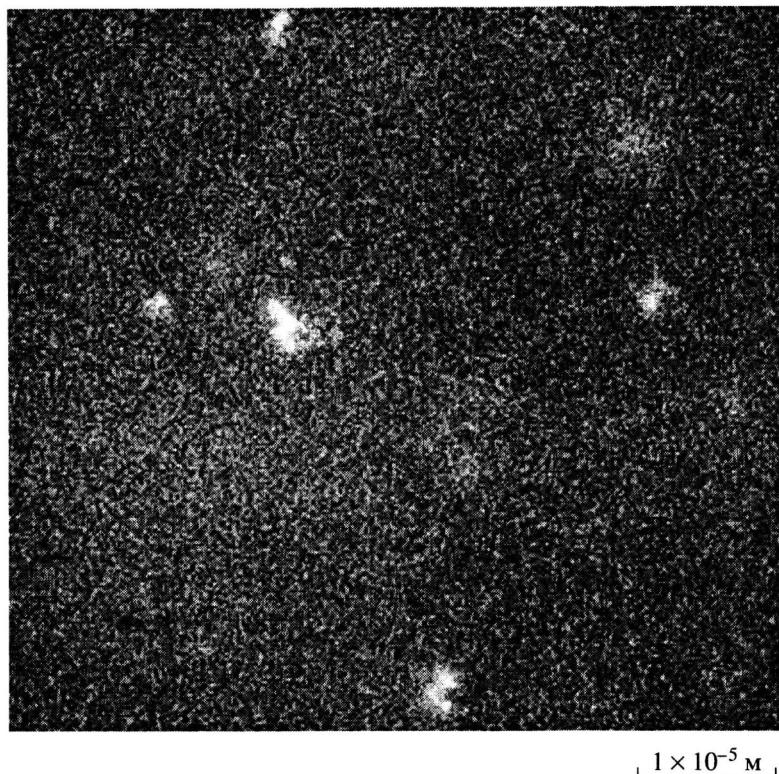


Рис. 3. Изображение ДНК Т4 в капле раствора, полученное с помощью флуоресцентного микроскопа.

цис-ДДП *транс*-ДДП выгоднее “искать” вторую входящую группу макромолекулы не на соседних основаниях, а на достаточно удаленных участках ДНК.

Заметим, что образование бидентатного комплекса *транс*-ДДП с ближайшими азотистыми основаниями одной молекулы приводят к дестабилизации двойной спирали из-за стерического несоответствия расположения входящих групп соседних пар оснований и замещающихся лигандов в координационной сфере платины. Такое связывание наблюдаются обычно при больших концентрациях платины [31]. В растворах малых концентраций образование межмолекулярной сшивки маловероятно, однако при фиксации макромолекул условия могут существенно отличаться от реализуемых в разбавленных растворах. Безусловно, при фиксации комплексов на поверхности из раствора могут произойти существенные изменения морфологии молекулы ДНК. В связи с этим интересно сопоставить полученные данные с результатами исследования аналогичных систем методом флуоресцентной микроскопии. В этом методе наблюдение за отдельными молекулами ДНК производится в капле раствора.

На рис. 3 представлено типичное изображение, полученное для раствора ДНК фага Т4. Молекулу ДНК аппроксимировали эллипсоидом вращения и фиксировали его максимальный раз-

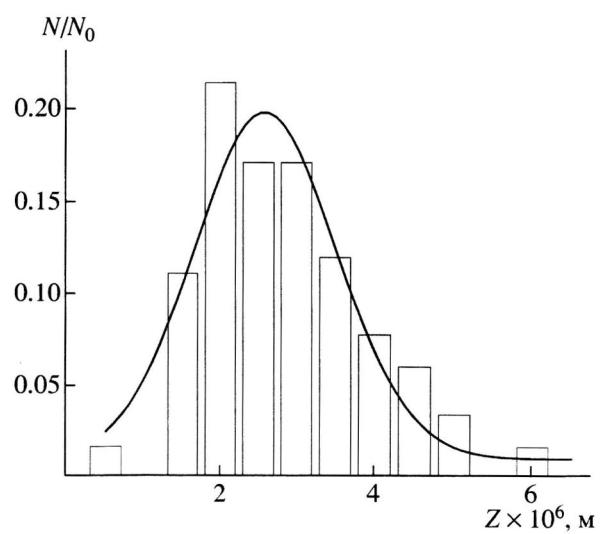


Рис. 4. Результат обработки изображений ДНК Т4, полученных методом флуоресцентной микроскопии. Функция распределения молекул по размерам получена в результате обработки 120 изображений.

Таблица 1. Результаты исследования комплексов ДНК с *цис*- и *транс*-ДДП методом флуоресцентной микроскопии в капле раствора 0.005 М NaCl при разных отношениях концентраций $r_{\text{Pt}} = c_{\text{Pt}}/c_{\text{ДНК}}$ (для всех систем $c_{\text{ДНК}} = 2.3 \times 10^{-7}$ моль/л, концентрация приведена в парах оснований ДНК)

ДНК, комплекс	Максимальный размер пятна (большая ось эллипсоида) $Z \times 10^6$, м	Среднеквадратичное расстояние между концами цепи $\langle h^2 \rangle^{1/2} \times 10^6$, м	$\langle R^2 \rangle^{1/2} \times 10^6$, м	Относительное изменение средних размеров клубка $Z/Z_{\text{ДНК}}$
ДНК	2.6 ± 0.4	1.86	0.74	1
ДНК + <i>цис</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 0.5$	2.4 ± 0.4	1.71	0.68	0.92
ДНК + <i>цис</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 1$	2.1 ± 0.3	1.50	0.6	0.8
ДНК + <i>цис</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 2.5$	2.1 ± 0.3	1.50	0.6	0.8
ДНК + <i>транс</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 0.1$	2.5 ± 0.4	1.79	0.72	0.96
ДНК + <i>транс</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 0.5$	2.4 ± 0.4	1.71	0.68	0.92
ДНК + <i>транс</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 1$	2.2 ± 0.3	1.57	0.63	0.85
ДНК + <i>транс</i> -ДДП, $r_{\text{Pt}} = 2.5$	2.2 ± 0.5	1.57	0.63	0.85

Таблица 2. Результаты вискозиметрических исследований ДНК и ее комплексов с соединениями платины ($c_{\text{Pt}} = 5 \times 10^{-5}$ моль/л)

ДНК, комплекс	Характеристическая вязкость $[\eta]$, м ³ /кг	Относительное изменение характеристической вязкости $[\eta]/[\eta]_0$
ДНК	6.3 ± 0.3	1
ДНК + <i>цис</i> -ДДП	3.9 ± 0.2	0.63
ДНК + <i>транс</i> -ДДП	4.2 ± 0.2	0.67

мер. Для построения распределения молекул ДНК по размерам использовали около 100 изображений. На рис. 4 представлены результаты обработки изображений ДНК фага T4 в 0.005 М NaCl. Исследования показали, что комплексообразование приводит к уменьшению размеров макромолекулы при всех используемых концентрациях. Результаты, полученные методом флуоресцентной микроскопии, суммированы в табл. 1. В этой таблице представлены средние максимальные размеры клубков Z , среднеквадратичные расстояния между концами макромолекулы $\langle h^2 \rangle^{1/2}$, которые вычисляются из соотношения $Z = 1.4\langle h^2 \rangle^{1/2}$, справедливого для гауссова клубка [32]. В данном случае значение среднеквадратичного радиуса инерции $\langle R^2 \rangle^{1/2}$ связано с величиной $\langle h^2 \rangle$ соотношением $\langle R^2 \rangle = 1/6\langle h^2 \rangle$. В последнем столбце приведены относительные изменения размеров ДНК. Из таблицы видно, что связывание соединений платины с молекулой ДНК уменьшает ее размер. Это согласуется с данными вискозиметрии.

В табл. 2 приведены результаты исследования гидродинамических свойств комплексов с помо-

щью низкоградиентного ротационного вискозиметра. Изучали комплексы, полученные слиянием растворов ДНК и соответствующего соединения платины заданной концентрации. Концентрация соединений платины в растворе 5×10^{-5} моль/л. Концентрационные зависимости приведенной вязкости свободной ДНК и ее комплексов с *цис*- и *транс*-ДДП в 0.005 М NaCl изучали после выдержки исходных растворов в течение 1 суток. Использовали процедуру разбавления, описанную ранее [31].

Падение характеристической вязкости ДНК (9000 пар оснований) после образования комплексов с *цис*-ДДП составило около 37%. Соответствующие вычисления для комплексов ДНК с *транс*-ДДП дают падение величины $[\eta]$ на 33%. В последнем случае нельзя говорить об изменении жесткости молекулы ДНК в процессе взаимодействия, так как образование комплекса сопровождается увеличением оптической анизотропии макромолекулы [21].

Поскольку характеристическая вязкость пропорциональна приведенному объему макромолекулы, уменьшение линейных размеров клубка

при комплексообразовании, наблюдаемое с помощью метода флуоресцентной микроскопии, хорошо согласуется с вискозиметрическими данными.

Следует отметить, что образование координационных связей соединений платины с ДНК может препятствовать дальнейшему взаимодействию макромолекулы с красителями, которые применяются для визуализации ДНК в описываемом выше эксперименте. Мы исследовали взаимодействие молекулы ДНК с красителем бромистым этидием после образования координационной связи с *цис*- и *транс*-ДДП. На рис. 5 представлены результаты спектрофотометрического титрования. Эти данные получены на полосе поглощения бромистого этидия (с максимумом около 470×10^{-9} м) при его постоянной концентрации 3×10^{-5} моль/л и при вариации $c_{\text{ДНК}}$ в пределах 0.001–0.03%. Титрование проводили добавлением одинакового количества соответствующего раствора бромистого этидия к рассчитанным концентрациям ДНК, приготовленным из исходного раствора. Вид полученных спектров (наличие изобистической точки) позволяет заключить, что существуют две спектральные формы, соответствующие связанному и свободному состоянию бромистого этидия. Известно, что бромистый этидий при связывании интеркалирует междуарами оснований ДНК. Как следует из рис. 5, использование комплексов с участием *цис*- и *транс*-ДДП не приводит к изменению вида спектров, хотя константа связывания бромистого этидия с ДНК меняется (табл. 3).

Константу связывания определяли по методу Скетчерда путем экстраполяции зависимости $r_b/c_{\text{своб}}$ от r_b , где r_b – число связанных молекул красителя на пару оснований ДНК, к нулевому значению r_b . *Транс*-ДДП оказывает меньшее воздействие на связывание бромистого этидия с ДНК, чем *цис*-ДДП. Возможно, это объясняется тем, что *транс*-ДДП предпочитает образовывать монодентатный комплекс (одна координационная связь платины с азотистым основанием макромолекулы) в отличие от *цис*-ДДП, для которой более характерно образование бидентатного комплекса (две координационных связи с соседними основаниями [21]). Заметим, что бидентатный комплекс *транс*-ДДП с разнесенными по цепи группами ДНК (или группами другой молекулы), образование которого нельзя исключить, по ха-

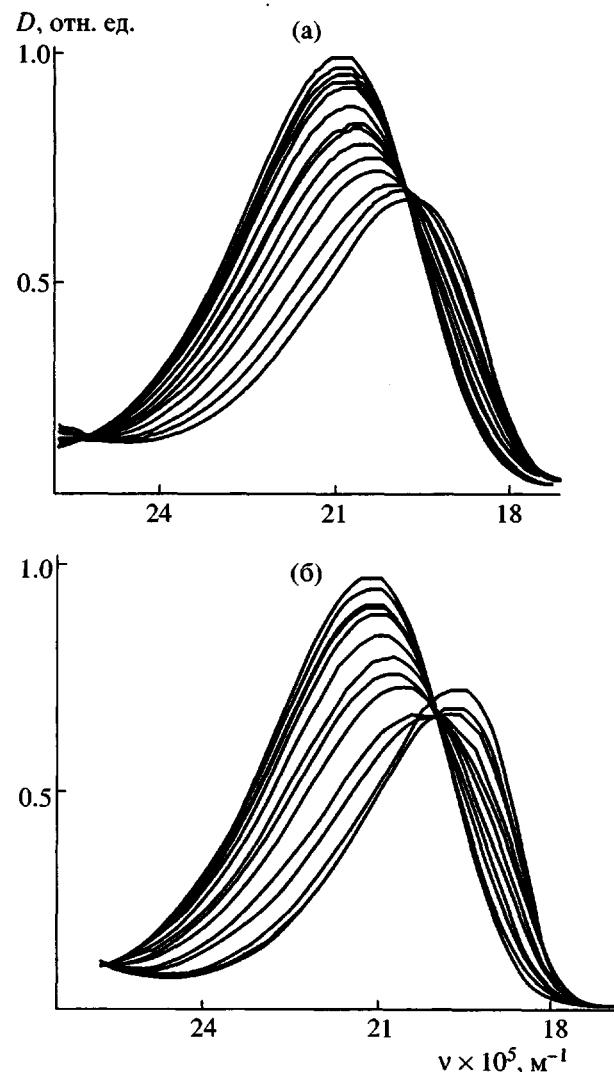


Рис. 5. Результаты спектрофотометрического титрования с использованием ДНК в комплексе с *цис*-ДДП (а) и *транс*-ДДП (б) ($c_{\text{Pt}} = 5 \times 10^{-5}$ моль/л, $c_{\text{EtBr}} = 3 \times 10^{-5}$ моль/л).

рактеру влияния на связывание этидия с ДНК мало отличается от монодентатного.

Влияние связывания ДНК с соединениями платины на ее последующее взаимодействие с бромистым этидием может быть обусловлено либо изменением геометрии двойной спирали (например, некоторые авторы отмечают изменение ширины и глубины малой бороздки), либо стерическими препятствиями для бромистого этидия из-за связывания платины с азотистыми основаниями ДНК. В любом случае изменение связывания красителя с ДНК не может существенно сказаться на результатах исследования систем методом флуо-

Таблица 3. Результаты спектрофотометрического титрования растворов ДНК с бромистым этидием в присутствии *транс*- и *цис*-ДДП

ДНК, комплекс	$c_{Pt} \times 10^5$, моль/л	Константа связывания бромистого этидия с ДНК $K \times 10^{-5}$
ДНК	0	20 ± 1
ДНК + <i>цис</i> -ДДП	1.37	12 ± 1
ДНК + <i>цис</i> -ДДП	5	2 ± 1
ДНК + <i>транс</i> -ДДП	5	15 ± 1

Таблица 4. Уменьшение интенсивности люминесценции бромистого этидия (E_{Br}) в комплексе с ДНК при связывании с *цис*-ДДП ($I_{\text{ДНК} + Pt}/I_{\text{ДНК}}$) (погрешность измерений 1.5%)

$c_{Pt}/c_{\text{ДНК}}$	$c_{E_{\text{Br}}}/c_{\text{ДНК}}$		
	0.01	0.1	0.4
Добавление бромистого этидия к комплексам ДНК + <i>цис</i> -ДДП			
0	1	1	1
0.2	0.98	0.94	0.97
0.4	0.97	0.94	0.97
0.8	0.88	0.89	0.88
Добавление бромистого этидия и <i>цис</i> -ДДП в раствор ДНК осуществлялось одновременно. Перед измерениями растворы выдерживали сутки			
0.2	—	0.94	0.94
0.4	—	0.95	0.98
0.8	—	0.88	0.89

ресурсной микроскопии, так как уменьшение константы связывания все же незначительно. Ее величина остается достаточно высокой.

Этот вывод подтверждается изучением люминесценции бромистого этидия в аналогичных системах. Исследования показали, что изменения фиксировались лишь в интенсивности люминесценции бромистого этидия при использовании комплексов ДНК с *цис*-ДДП (табл. 4). Интенсивность люминесценции монотонно падает при увеличении соотношения $c_{Pt} : c_{\text{ДНК}}$. Это наблюдается в широком диапазоне отношения $c_{E_{\text{Br}}} : c_{\text{ДНК}}$. Данный эффект не может быть вызван уменьшением доли связанного красителя при использовании комплексов ДНК с *цис*-ДДП, исходя из получен-

ных значений констант связывания (табл. 3). Можно предположить, что причиной обсуждаемых изменений являются фотопроцессы в возбужденном состоянии бромистого этидия, связанные с переносом электрона. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования.

Обратимся к экспериментальным результатам, полученным методом динамического светорассеяния. Высокомолекулярная ДНК является весьма сложным объектом для изучения методом динамического рассеяния света в силу своей полизелектролитной природы и высокой жесткости. Во многих проведенных ранее исследованиях в спектрах релаксации обнаруживали два и даже три максимума [13, 33, 34], которые можно интерпретировать различным образом. Полученные нами из автокорреляционных функций времена релаксации быстрого релаксационного процесса мы попытались сопоставить с поступательной диффузией молекулы ДНК, а также проанализировали влияние присутствия соединений платины на полученные результаты.

На рис. 6 приведены зависимости кажущегося коэффициента диффузии от q^2 . Результаты экстраполяции к $q = 0$ представлены в табл. 5. Необходимо отметить, что измерения выполнены для одной концентрации ДНК. Таким образом, корректно говорить только о коэффициенте взаимодиффузии, а не о коэффициенте самодиффузии, который определяется при экстраполяции концентрационной зависимости коэффициента диффузии к нулевой концентрации. Используя полученные значения характеристической вязкости ДНК и ее комплексов с *цис*- и *транс*-ДДП, можно с помощью гидродинамического инварианта A_0 попытаться оценить ожидаемую величину коэффициента трансляционной диффузии

$$A_0 = D_t \eta_0 ([\eta] M)^{1/3} / T = 3.4 \times 10^{-17} \text{ Дж/град } M^{1/3} [35]$$

Расчеты дают величину $D_t = (1.4 \pm 0.1) \times 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ для свободной ДНК, $(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ для комплекса ДНК с *цис*-ДДП и $(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ для комплекса ДНК с *транс*-ДДП. Видно, что наблюдается вполне удовлетворительное совпадение результатов, полученных двумя методами.

Оценку среднеквадратичного расстояния между концами цепи мы провели, воспользовавшись

Таблица 5. Результаты исследования систем методом динамического рассеяния света

ДНК, комплекс	$D(0) \times 10^{12}$, м ² /с	$D_{\tau} \times 10^{12}$, м ² /с	$\tau_f(90)$, с	$\tau_s(90)$, с	$\langle h^2 \rangle^{1/2} \times 10^9$, м
ДНК	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.00053*	0.01*	688
			0.00058**	0.009**	
ДНК + <i>цис</i> -ДДП	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.00074*	0.01*	482
			0.00081**	0.009**	
ДНК + <i>транс</i> -ДДП	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.00075*	0.011*	500
			0.0008**	0.009**	

Примечание. $D(0)$ – коэффициент взаимодиффузии, полученный из данных динамического рассеяния света при экстраполяции величины $1/q^2 \tau_f$ к значению $q = 0$; D_{τ} – коэффициент трансляционной диффузии, рассчитанный из $[\eta]$; $\tau_f(90)$ – время релаксации (быстрая мода), определенное под углом 90° ; $\tau_s(90)$ – время релаксации (медленная мода), определенное под углом 90° .

* Рассчитано из модели двух мод.

** Получено методом обратного преобразования Лапласа.

известным выражением для коэффициента поступательного трения макромолекулы

$$f = P_0 \eta_0 \langle h^2 \rangle^{1/2},$$

где $f = kT/D_{\tau}$, $P_0 = 5.11$, η_0 – вязкость растворителя. Эти данные также представлены в табл. 5.

Относительно медленного релаксационного процесса (в двухмодовом приближении для автокорреляционной функции), фиксируемого для всех изученных методом динамического рассеяния света систем, можно высказать следующие

предположения. Наличие “медленной моды” корреляционной функции нельзя объяснить межмолекулярными взаимодействиями, так как при используемой концентрации ДНК объемная доля набухших клубков не превышает 0.5. Возможно, появление “медленной моды” является следствием полиэлектролитной природы исследуемого полимера и невысокой ионной силы растворов. В этом случае на измеряемую автокорреляционную функцию оказывают влияние электростатические взаимодействия [14]. То обстоятельство, что вклад медленного релаксационного процесса становится менее выраженным с повышением ионной силы раствора, не противоречит высказанному предположению. Например, опыт показал, что увеличение ионной силы до 0.5 M NaCl значительно уменьшает ширину спектра времен релаксации.

Таким образом, использование в работе различных методов, в том числе методов прямого наблюдения за конформацией макромолекул, привело к получению взаимно непротиворечивых результатов. Это позволяет в дальнейшем расширить разработанный подход на исследование более сложных систем, в том числе комплексов ДНК с новыми многоядерными соединениями платины.

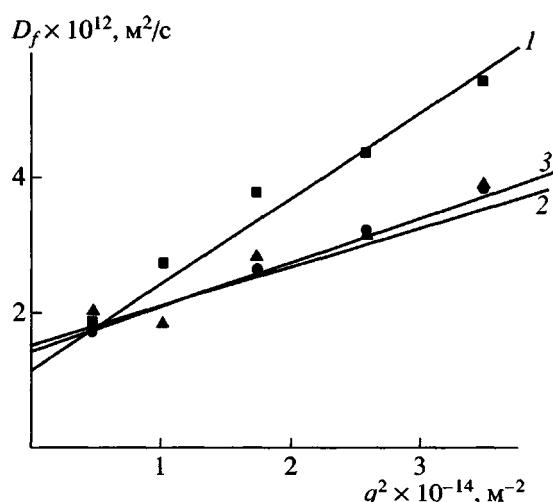


Рис. 6. Зависимость кажущегося коэффициента диффузии от волнового вектора для раствора ДНК (1), ее комплексов с *цис*-ДДП (2) и *транс*-ДДП (3) в 0.005 M NaCl.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rosenberg B. // Platinum Metals Rev. 1971. V. 15. № 1. P. 42.

2. *Natile G., Coluccia M.* // *Coordin. Chem. Rev.* 2001. V. 216–217. № 1. P. 383.
3. *Reedijk J.* // *Inorg. Chim. Acta.* 1992. V. 198–200. № 2. P. 873.
4. *Kartalou M., Essigmann J. M.* // *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2001. V. 478. № 1–2. P. 23.
5. *Dabholkar M., Vionnet J.A., Bostick-Bruton F., Yu J.J., Reed E.* // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. № 4. P. 703.
6. *McMahon S.B., Priestley J.V.* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995. V. 5. № 6. P. 616.
7. *Jolley J.N., Yanovsky A.I., Kelland L.R., Nolan K.B.* // *J. Inorg. Bioch.* 2001. V. 83. № 2–3. P. 91.
8. *Rauko P., Novotny L., Dovinova I., Hunakova L., Szekeres T., Jayaram H.N.* // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001. V. 12. № 4. P. 387.
9. *Peleg-Shulman T., Katzhendler J., Gibson D.* // *J. Inorg. Bioch.* 2000. V. 81. № 4. P. 313.
10. *Takahara P.M., Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard S.J.* // *Nature.* 1995. V. 377. № 6550. P. 649.
11. *Huang H., Zhu L., Reid B.R., Drobny G.P., Hopkins P.B.* // *Science.* 1995. V. 270. № 5243. P. 1842.
12. *Спирин А.С.* // *Биохимия.* 1958. Т. 23. № 3. С. 656.
13. *Seils J., Pecora R.* // *Macromolecules.* 1995. V. 28. № 3. P. 661.
14. *Stepanek P.* // *Dynamic Light Scattering, the Method and Some Applications* / Ed. by Brown W. Oxford: Clarendon Press, 1993.
15. *Птицын О.Б., Эйзнер Ю.Е.* // *Журн. техн. физики.* 1959. Т. 29. № 4. С. 966.
16. *Yamakawa H., Fudjii M.* // *Macromolecules.* 1974. V. 7. № 1. P. 128.
17. *Horacek P., Drobnick J.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1971. V. 254. № 2. P. 341.
18. *Касьяненко Н.А., Сэльман Х.С.Г., Уверский В.Н., Фрисман Э.В.* // *Молек. биология.* 1987. Т. 21. № 1. С. 140.
19. *Kasyanenko N.A., Zanina A.V., Simonenkov A.A., Defrenne S., Nazarova O.V., Panarin E.F.* // *Macromol. Symp.* 1998. V. 136. P. 25.
20. *Галлямов М.О., Яминский И.В.* // *Нуклеиновые кислоты. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров* / Под ред. Яминского И.В. М.: Научный мир, 1997. С. 25.
21. *Касьяненко Н.А., Фрисман Э.В., Валуева С.В., Сморыго Н.А., Дьяченко С.А.* // *Молек. биология.* 1995. Т. 29. № 2. С. 345.
22. *Iwamoto M., Mukundan S.Jr., Marzilli L.G.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. № 14. P. 6238.
23. *Chao C.C., Huang S.L., Lee L.Y., Lin-Chao S.* // *Biochem. J.* 1991. V. 277. № 3. P. 875.
24. *Calsou P., Frit P., Salles B.* // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. № 23. P. 6363.
25. *Chu G.* // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 2. P. 787.
26. *Den Hartog J.H.J., Altona C., van der Marel G.A., Reedijk J.* // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 147. № 2. P. 371.
27. *Den Hartog J.H.J., Altona C., van Boom J.H., van der Marel G.A., Haasnoot C.A.G., Reedijk J.* // *J. Biomolec. Struct. Dyn.* 1985. V. 2. № 6. P. 1137.
28. *Herman F., Kozelka J., Stoven V., Guittet E., Girault J.P., Huynh-Dinh T., Igolen J., Lallemand J.Y., Chottard J.C.* // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 194. № 1. P. 119.
29. *Bellon S.F., Coleman J.H., Lippard S.J.* // *Biochemistry.* 1991. V. 30. № 32. P. 8026.
30. *Rampiro J.N.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 182. № 1. P. 201.
31. *Касьяненко Н.А., Фрисман Э.В., Карымов М.А., Сморыго Н.А., Дьяченко С.А.* // *Молек. биология.* 1995. Т. 29. № 3. С. 580.
32. *Kuhn W.* // *Kolloid. Z.* 1939. V. 87. № 68. P. 3.
33. *Goinga H.T., Pecora R.* // *Macromolecules.* 1991. V. 24. № 23. P. 6128.
34. *Newman J., Tracy J., Pecora R.* // *Macromolecules.* 1994. V. 27. № 23. P. 6808.
35. *Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я.* Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964.

Study of DNA Complexation with Platinum Coordination Compounds

N. A. Kas'yanenko*, S. S. Abramchuk**, I. V. Blagodatskikh**,
A. A. Bogdanov*, M. O. Gallyamov***, A. I. Kononov*, Yu. V. Kosmotynskaya*,
N. L. Sitnikova**, and A. R. Khokhlov**

*Faculty of Physics, St. Petersburg State University,
Ul'yanovskaya ul. 1, Petrodvorets, 198504 Russia

**Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

***Faculty of Physics, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia

Abstract—Complexes of DNA with *cis*-diamminedichloroplatinum and *trans*-diamminedichloroplatinum were studied by low-gradient viscometry, spectrophotometry, luminescence, dynamic light scattering, and fluorescence and atomic force microscopy. It was demonstrated that a DNA molecule decreases in size upon its interaction with platinum coordination compounds. The formation of DNA complexes with *cis*-diamminedichloroplatinum reduces the luminescence intensity and the constant of ethidium bromide binding with DNA, while in the case of *trans*-diamminedichloroplatinum, these effects turn out to be somewhat less pronounced.