

Биология

УДК 577.113.6

Р. Р. ВАРДАПЕТЯН, А. С. РЯЗАНОВА, А. П. АНТОНЯН

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ПОДОФИЛЛОТОКСИНА
И ЭТОПОЗИДА С ДНК РАЗЛИЧНОГО ГЦ-СОДЕРЖАНИЯ

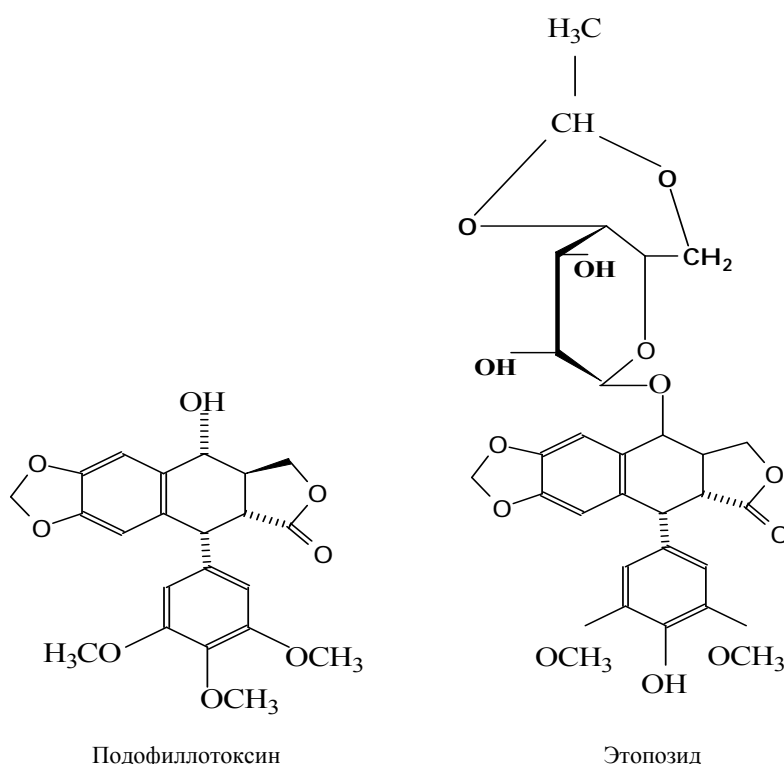
Проведено исследование связывания подофиллотоксина и этопозиды с ДНК различного гуанин-цитозин содержания методом тепловой денатурации. Обнаружено, что подофиллотоксин и этопозид проявляют дестабилизирующее влияние на ДНК. Выявлено, что оба соединения предпочтительнее связываются с АТ-богатыми участками ДНК.

Введение. Подофиллотоксин (Ptox) и его производные, в частности эпиподофиллотоксин (этопозид), являются антинеопластическими агентами, ингибирующими функции топоизомеразы ДНК у животных [1–7]. Эти вещества имеют комбинированное влияние на функционирование клетки. Ptox и этопозид блокируют образование микротрубочек при митозе, вследствие чего процесс деления клеток прекращается [8]. Некоторые производные Ptox, в том числе и этопозид, используются в химиотерапии рака [9]. Эти лиганды в основном связываются с топоизомеразами ДНК, которые необходимы при расплетении ДНК в процессе репликации, что также приводит к прекращению деления клеток. В последнее время получены данные о непосредственном связывании этих веществ с ДНК, что также лежит в основе их цитотоксичности [10]. С этой точки зрения *in vitro* исследования взаимодействия Ptox, этопозиды и других полусинтетических производных подофиллотоксина с ДНК важны для лучшего понимания особенностей влияния этих веществ на функционирование клетки.

Целью данной работы явилось исследование связывания Ptox и этопозиды (см. схему) с ДНК различного ГЦ-содержания.

Материалы и методы. В работе были использованы лиганды подофиллотоксин («Merk», Германия) и этопозид («Biomedicals», США). Использовали следующие виды ДНК: *Cl. perfr.* (среднее ГЦ-содержание $X_{ГЦ}=32\%$), тимуса телят *Calf Thymus* ($X_{ГЦ}=42\%$), *M. lysod.* ($X_{ГЦ}=72\%$, «Sigma», США). Комплексы Ptox–ДНК и этопозид–ДНК готовили добавлением маточного раствора лиганда (конечная концентрация метанола не превышала 2,5%) к раствору нуклеиновой кислоты в 10 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) в

молярных соотношениях r =лиганд/ДНК, равных 1:100, 1:50, 1:25, 1:20 и 1:10. Соответствующие концентрации лигандов и ДНК получали путем разбавления маточных растворов. Маточные растворы лигандов готовили растворением сухих препаратов в метаноле, а маточные растворы ДНК – в 10 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0). Соответствующие концентрации ДНК получали с учетом коэффициентов экстинкции: $\varepsilon_{260}=7400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для *Cl. perfr.* и $\varepsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для *Calf Thymus* и *M. lysod.* В разработанной нами системе Ртох и этопозид свободно растворяются в широком спектре концентраций в Na-фосфатном буфере.

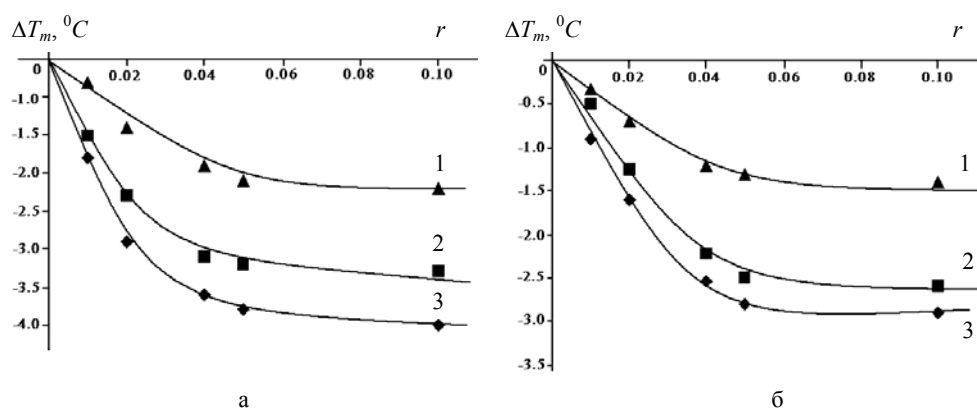


Плавление указанных ДНК и их комплексов с лигандами осуществляли на спектрофотометре PUE UNICAM-SP8-100 (Англия). Спектральные измерения проводили в герметически закрытых кварцевых кюветах (длина оптического пути 1 см), которые помещали в термостатируемые ячейки спектрофотометра и нагревали со скоростью 0,25 град/мин. Данные поглощения образцов выводились на программируемый микрокалькулятор Hewlett Packard 97S I/O (США). Измерения каждого образца проводили с 5-кратным повтором, после чего данные усредняли. Ошибка экспериментальных результатов не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. Для исследования взаимодействия Ртох и этопозид с ДНК различного ГЦ-содержания были получены кривые плавления их комплексов (кривые не приведены). Известно, что Ртох и его производные

водные предпочтительнее связываются с поврежденными участками ДНК [11]. В свою очередь, поврежденные участки ДНК могут образовываться вследствие расхождения комплементарных нитей в ходе плавления, а также индуцирования таких участков подофиллотоксинами. Это приводит к тому, что кривые плавления комплексов Ptox и этопозида с ДНК сдвинуты в сторону низких температур по сравнению с таковыми для чистой ДНК. При этом уменьшение температуры плавления исследуемых комплексов более выражено для этих соединений с ДНК *Cl. perfr.* и тимуса телят по сравнению с комплексами Ptox (этопозида) с ДНК *M. lysod.*

На рисунке приведены кривые зависимостей изменения температуры плавления ΔT_m ($\Delta T_m = T_m - T_0$, где T_0 и T_m – температуры плавления чистой ДНК и ее комплексов с лигандами соответственно) комплексов Ptox (а) и этопозида (б) с ДНК различного ГЦ-содержания от r . Как видно из рисунка, поведение всех кривых практически одинаково, что указывает на то, что связывание этих лигандов с разными ДНК происходит по одинаковому механизму.



Кривые зависимостей изменения температуры плавления (ΔT_m) комплексов Ptox (а) и этопозида (б) с ДНК различного ГЦ-содержания от r : 1 – *M. lysod.*; 2 – *Calf Thymus*; 3 – *Cl. perfr.*

В таблице приведены значения ΔT_m и $\delta \Delta T_m$ ($\delta \Delta T_m = \Delta T_m^{\text{ДНК-этопозид}} - \Delta T_m^{\text{ДНК-Ptox}}$) для различных значений r . Как видно из табличных данных, с увеличением ГЦ-содержания ДНК $\delta \Delta T_m$ имеет тенденцию к уменьшению. Максимальный эффект и для Ptox, и для этопозида достигается при $r=0,04$: в случае ДНК *Cl. perfr.* $\delta \Delta T_m=0,9$, для ДНК *Calf Thymus* – 0,7, а для *M. lysod.* – 0,2. При дальнейшем увеличении соотношения лиганд/ДНК $\delta \Delta T_m$ практически не меняется. Этот экспериментально полученный результат может быть следствием того, что и для Ptox, и для этопозида мишенью на ДНК являются АТ-богатые участки, которые в большей степени подвергаются повреждению со стороны лигандов. Вследствие этого значение ΔT_m больше в случае взаимодействия АТ-богатых ДНК с Ptox и этопозидом, чем в случае ГЦ-богатых ДНК. Так, для ДНК *Cl. perfr.* и *Calf Thymus* $\delta \Delta T_m$ больше, чем для *M. lysod.* С увеличением концентраций этих лигандов кривые зависимости

ΔT_m выходят на плато, поскольку АТ-богатые участки, являющиеся мишенью для этих соединений, ограничены.

Значения ΔT_m и $\delta\Delta T_m$, полученные для комплексов ДНК различного ГЦ-содержания с Pтох и этопозидом в зависимости от соотношения ДНК/лиганд

Молярное соотношение, r	$\Delta T_m, ^\circ\text{C}$						$\delta\Delta T_m, ^\circ\text{C}$		
	Среднее ГЦ-содержание						Среднее ГЦ-содержание		
	ДНК–Pтох			ДНК–этопозид					
	32%	42%	72%	32%	42%	72%	32%	42%	72%
0,01	-1,3	-1,0	-0,3	-0,8	-0,6	-0,2	0,5	0,4	0,1
0,02	-2,3	-2,0	-0,9	-1,6	-1,4	-0,7	0,7	0,6	0,2
0,04	-3,2	-2,8	-1,4	-2,3	-2,1	-1,2	0,9	0,7	0,2
0,05	-3,3	-2,7	-1,6	-2,8	-2,3	-1,3	0,5	0,4	0,3
0,10	-3,5	-2,8	-1,7	-3,1	-2,5	-1,4	0,4	0,3	0,3

В то же время, полученные экспериментальные значения $\delta\Delta T_m$ в случае ДНК *M. lysod.* ($X_{\text{ГЦ}}=72\%$) качественно отличаются от аналогичных данных, полученных для ДНК *Cl. perfr.* и *Calf Thymus*. Это является косвенным подтверждением вышеописанного, так как на ДНК *M. lysod.* центры связывания для Pтох и этопозидов сильно ограничены и эта ДНК менее подвержена образованию повреждений.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что и Pтох, и этопозид могут непосредственно связываться с ДНК и их цитотоксичность может быть обусловлена как ингибированием топоизомераз I и II ДНК животных клеток, так и дестабилизацией и повреждениями самой ДНК.

Кафедра биофизики

Поступила 27.09.2010

ЛИТЕРАТУРА

1. **Watt P.M., Hickson I.D.** J. Biochem., 1994, v. 303, p. 681.
2. **Beers S.A., Imakura Y., Dai H.J., Li D.H., Cheng Y.C., Lee K.** J. Nat. Prod., 1998, v. 51, № 5, p. 901–906.
3. **Jyothi P., Jagetia G., Krishnamurthy H.** Toxicology, 2001, v. 163, № 2–3, p. 163–174.
4. **Felix C.A.** Med. Pediatr. Oncol., 2001, v. 36, № 5, p. 525–535.
5. **Rubin E., Hait W.** Cancer Medicine. Inc. London, 2000, p. 670–679.
6. **Macdonald T.L., Lehnert E.K., Loper J.T.** et al. In DNA Topoisomerases in Cancer (eds. Potmesil M. and Kohn K.W.). New York: Oxford University Press, 1991, p. 199–214.
7. **Anyanwutaku I.O., Guo X., Chen H.X.** et al. Mol. Pharmacol., 1996, v. 49, p. 721–726.
8. **Damayanthi Y., Lown J.** Curr. Med. Chem., 1998, v. 5, p. 205–252.
9. **Allevi P., Anastasia M., Ciuffreda P., Bigatti E., Macdonald P.** J. Organic Chemistry, 1993, v. 58, p. 4175–4178.
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide>
11. **Bastow K.F., Wang Hui-Kang, Cheng Yung-Chi, Lee Kuo-Hsiung.** J. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 1997, v. 5, № 8, p. 1481–1488.

Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Ա. Ս. ՌՅԱԶԱՆՈՎԱ, Ա. Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ

ՏԱՐԲԵՐ GC-ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹԱՄԲ ԳՆԹ-ՆԵՐԻ ՀԵՏ
ՊՈԴՓԻՒՆՏՈՔՍԻՆԻ ԵՎ ԷՏՈՊՈԶԻԴԻ ԿԱՊՄԱՆ ՈՐՈՇ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է տարբեր գուանին-ցիտոզին պարունակությամբ ԳՆԹ-ների հետ պոդոֆիլոտոքսինի և էտոպոզիդի միացումը ջերմային դենատուրացման մեթոդով: Յույց է տրվել, որ պոդոֆիլոտոքսինը և էտոպոզիդը ապակայունացնող ազդեցություն ունեն ԳՆԹ-ի վրա: Բացահայտված է, որ երկու միացություններն էլ նախընտրելիորեն կապվում են ԳՆԹ-ի AT-հարուստ տեղամասերի հետ:

H. R. VARDAPETYAN, A. S. RYAZANOVA, A. P. ANTONYAN

SOME PECULIARITIES OF BINDING PODOPHYLLOTOXIN AND
ETOPOSIDE WITH DNA OF DIFFERENT GC-CONTENT

Summary

Investigation of binding podophyllotoxin and etoposide with DNA of different guanine-cytosine content has been carried out using the method of thermal denaturation. It has been revealed, that podophyllotoxin and etoposide have a destabilizing effect on DNA. It has been shown that both compounds are preferably bound to AT-rich sites of DNA.