

УДК 577.3

С. Г. АРУТЮНЯН, В. И. ВАРДАНЯН, Е. Б. ДАЛЯН

ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ ДНК С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Настоящий обзор посвящен анализу особенностей комплексообразования ДНК с обратимо и необратимо связывающимися лигандами. В качестве обратимо связывающихся выбраны три класса низкомолекулярных лигандов, характеризующихся различными механизмами связывания. Такими лигандами, в частности, являются ионы двухвалентных металлов первого переходного ряда, порфириновые комплексы, а также аминокислоты цвиттерионного типа. В качестве необратимо связывающихся лигандов выбраны соединения Pt(II) и Ru(III). Выбор этих лигандов обусловлен тем, что они охватывают почти все возможные типы взаимодействий с ДНК, существующих в реальных системах.

В работе проводится систематизация общих закономерностей взаимодействия вышеперечисленных классов лигандов с ДНК и выявляются их специфические различия.

Конформация и стабильность ДНК в присутствии низкомолекулярных лигандов

В настоящее время имеется довольно много как экспериментальных, так и теоретических работ, свидетельствующих о том, что двухцепочечная молекула ДНК может существовать в мало отличающихся друг от друга по энергиям конформациях (А-, В-, Z- и т.д. формы ДНК) [1-3]. Эти формы отличаются расположением пар оснований и углом их наклона по отношению к оси спирали, а также знаком закрутки двойной спирали (А- и В-формы – правозакрученные, а Z-форма – левозакрученная) [1-5]. А-форма ДНК характеризуется пониженной влажностью и существует в смесях воды с органическими растворителями в волокнах [1, 4, 6]. В В-семействе форм в зависимости от величины угла спирального вращения возможно существование конформаций ДНК типа В-, С-, Т- и Д-форм. Поскольку условия существования В-формы ДНК наиболее близки к условиям среды в клетке, то В-форма считается основной.

Хотя формы В-семейства наиболее устойчивы при физиологических условиях, однако в процессе функционирования ДНК в клетке возможна реа-

лизация и других ее конформационных состояний. Некоторые из них могут стабилизироваться белками, иные возникают в качестве промежуточных состояний при функционировании ДНК. К таким формам следует отнести и левозакрученные Z- и Z', а также так называемые Ψ-формы [4–6]. Ψ-форма является наиболее компактной формой ДНК. Возникновение подобных структур обусловлено уменьшением растворимости ДНК при изменении условий среды, в результате чего происходит внутримолекулярная компактизация или же образуются холестерические жидкокристаллические структуры при агрегации ДНК [7].

Z-форма ДНК в отличие от других известных – левая регулярная спираль [4, 5, 8]. Ее повторяющаяся единица – два нуклеотида. Это, очевидно, связано с тем, что Z-форма получается в основном для чередующихся последовательностей (напр., CGCGCG). Среднее спиральное вращение в расчете на пару оснований составляет 30° , а пары в Z-форме повернуты на 180° относительно сахарофосфатного остова B-формы [4]. Структуру Z-формы ДНК от других отличает также конформация сахарного кольца (C1'-экзо вместо C3'-эндо для A-формы и C2'-эндо для B-формы). Конформационные переходы между семействами форм носят скачкообразный характер, а переходы внутри каждого семейства происходят плавно и непрерывно.

Существование большого разнообразия различных форм ДНК указывает на то, что в растворах ДНК все время происходят конформационные колебания. В них могут происходить локальные раскрытия двойной спирали [9]. На основе теоретического анализа опытов со сверхспиральной ДНК показано, что двойная спираль может испытывать также крутильные колебания [10].

Чрезвычайно интересным с точки зрения понимания основных процессов функционирования нуклеиновых кислот (регуляция, транскрипция, трансляция, рекомбинация) считается явление перехода спираль–клубок ДНК. Этот процесс, являющийся результатом воздействия на ДНК условий среды (температуры, pH, содержания ионов металлов в растворе, состав и структура растворителя), впервые был обнаружен Доти с сотрудниками [11] и интенсивно изучался в последующие годы многими авторами (см., напр., [12–14]).

ДНК представляет собой одномерный аperiodический кристалл [12]. Одномерность обусловлена тем, что каждая элементарная ячейка (пара оснований) молекулы взаимодействует лишь с двумя соседними ячейками (координационное число равно 2), а аperiodичность – тем, что молекула состоит из элементарных ячеек двух сортов АТ- и ГЦ-пар нуклеотидов, причем периодичность исключена, поскольку последовательностью нуклеотидов определяется вся генетическая информация. Выяснение особенностей плавления этих одномерных аperiodических кристаллов представляется исключительно важной задачей как для физики вообще, так и для молекулярной биофизики в частности.

В биспиральном состоянии ДНК имеет весьма жесткую структуру, ее статистический сегмент довольно велик (до 300 пар оснований). Такая цепь

обычно характеризуется гауссовым распределением расстояний между ее концами.

Молекулярные свойства и термодинамические характеристики ДНК в спиральном и клубкообразном состояниях существенно различны, что и позволяет изучать переход спираль–клубок разными методами: УФ- и ИК-спектроскопией [15–20], вискозиметрией [21, 22], микрокалориметрией [23, 24], круговым дихроизмом (КД) [1, 3, 25, 26], дисперсией оптического вращения [27] и т.д.

Стабильность двойной спирали ДНК определяется величиной свободной энергии перехода спираль–клубок. Эта величина включает в себя свободные энергии взаимодействия оснований в противоположных цепях, свободную энергию межплоскостного взаимодействия оснований (стэкинг взаимодействия), изменения свободной энергии взаимодействия фосфатных групп с противоионами и водным окружением, а также изменение конформационной свободной энергии [28–33]. С этой точки зрения несомненный интерес представляет изучение комплексов ДНК с веществами, способными изменять конформацию и стабильность макромолекулы. И это естественно, ведь огромное количество физиологических процессов в живых системах является прямым отражением взаимодействия ДНК с разными низко- (ионы металлов, аминокислоты, антибиотики и др.) и высокомолекулярными (напр., белки) веществами. По типу их связывания с ДНК эти вещества можно разделить на две группы: *обратимо* и *необратимо* связывающиеся.

При необратимом связывании вещество ковалентно сшивается с ДНК, что приводит к необратимой модификации ее структуры. К таким веществам относятся некоторые металлсодержащие препараты.

Конформация и термостабильность ДНК весьма чувствительны также к взаимодействию с обратимо связывающимися с ней веществами. Обратимо связывающиеся вещества, в свою очередь, можно подразделить на два класса: первый – это непосредственно взаимодействующие с ДНК (напр., ионы металлов, протон, порфирины и металлопорфирины и т.д.), второй – опосредованно (изменение конформации и термостабильности ДНК происходит через изменение свойств растворителя) влияющие на макромолекулу. К последнему роду соединений можно отнести, например, мочевины, а также аминокислоты цвиттерионного типа.

Связывание большинства веществ, относящихся к первой группе, хорошо описывается двумя состояниями – связанным с макромолекулой и несвязанным с ней. В некоторых случаях связанных состояний может быть несколько типов, например, для порфиринов. Такие вещества принято называть лигандами (или скрепками). К ним относятся, в первую очередь, ионы металлов, способные адсорбироваться на строго определенных центрах связывания ДНК [34–41]. Состояние лиганда (связанное с ДНК или несвязанное) зависит как от условий среды и состава растворителя, так и от концентрации самого лиганда.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что нет единого механизма для объяснения конформационных переходов как внутри семейства

форм ДНК, так и между ними. Каждый случай подобного перехода имеет свои особенности, и выяснение этих особенностей может дать дополнительную информацию о природе сил, стабилизирующих ту или иную структуру. Как известно, изучение условий существования той или иной конформации и их взаимных превращений имеет большое значение для понимания механизмов функционирования различных комплексов ДНК с низко- и высокомолекулярными соединениями.

С этой точки зрения весьма интересным представляется изучение влияния ряда редких аминокислот, стехиометрических концентраций ионов металлов первого переходного ряда, порфириновых комплексов, металлосодержащих соединений на конформационное состояние и стабильность ДНК. Подбор указанных соединений оправдывается тем, что они охватывают практически все типы комплексообразования лигандов с ДНК, существующие в реальных системах.

I. Обратимо связывающиеся лиганды

а) Редкие аминокислоты-цвиттерионы. Интересным классом обратимо связывающихся с ДНК лигандов являются аминокислоты-цвиттерионы, имеющие четко разделенные заряды. К ним относятся глицин, β-аланин, γ-аминомасляная кислота (γ-АМК) – редкие аминокислоты, известные своими фармакологическими свойствами. Выяснение механизмов взаимодействия этих веществ с ДНК создает предпосылки для понимания ряда особенностей взаимодействия ДНК с белками, сопутствующими протеканию всех без исключения биологических процессов в клетке.

Переход спираль–клубок. В литературе имеется ограниченное число работ, посвященных изучению взаимодействия ДНК с веществами аналогичного химического строения [42–44]. Анализ этих работ показывает, что диамины типа $H_2N-(CH_2)_n-NH_2$ приводят к повышению температуры плавления (T_m) ДНК [43, 44]. Причем максимум эффекта достигается при $n=5$. Дальнейшее увеличение метиленовых групп приводит к постепенной дестабилизации ДНК. Предполагается, что уменьшение термостабильности ДНК при $n>5$ идентично действию органических растворителей, которые, создавая неполярную атмосферу вокруг ДНК, приводят к ее дестабилизации [43, 44]. Постепенное же увеличение T_m при изменении n от 1 до 5 предполагается обусловленным специфическим связыванием диаминов: одна аминогруппа связывается с фосфатной группой, а другая – с азотистыми основаниями А или Т. Моноамины при малых концентрациях стимулируют дестабилизацию двойной спирали [42], а при дальнейшем повышении их содержания в растворе приводят к стабилизации ДНК. При концентрациях аминов, стабилизирующих двойную спираль, изменяется конформация ДНК – происходит В–С-подобный конформационный переход. Авторы вышеуказанных работ связывают стабилизирующее действие низкомолекулярных моноаминов с неспецифическим взаимодействием аминогрупп лигандов с фосфатными группами ДНК, а дестабилизирующее действие при малых концентрациях моноаминов – с их взаимодействием с азотистыми основаниями.

УФ-спектрофотометрическое исследование термодинамических особенностей ДНК в водных растворах глицина, β -аланина и γ -АМК показывает, что температура плавления (T_m) и ширина температурного интервала (ΔT) перехода спираль-клубок ДНК зависят от ионной силы растворителя и концентрации аминокислот (рис. 1, 2).

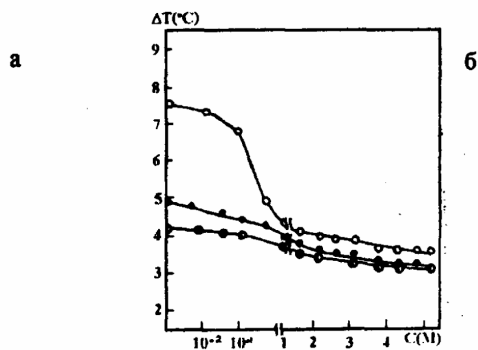
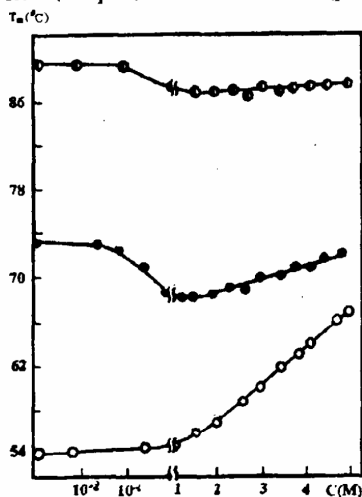


Рис. 1. Зависимость температуры плавления (а) и интервала перехода спираль-клубок (б) ДНК тимуса теленка от концентрации β -аланина при ионных силах: \bullet - 0,02M, \circ - 0,2M, \times - 0,002M [Na⁺].

Характер термочувствительности ДНК зависит также от вида аминокислоты. Результаты, приведенных на рис. 3, свидетельствуют о том, что

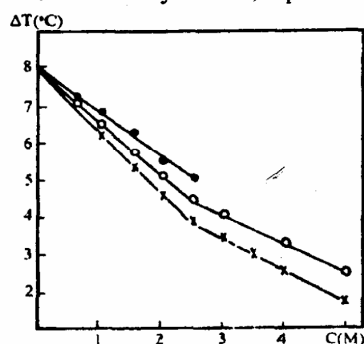


Рис. 2. Зависимость интервала перехода спираль-клубок ДНК тимуса теленка от концентрации аминокислоты: \bullet - глицин, \circ - β -аланин, \times - γ -АМК.

увеличение числа метиленовых групп в аминокислотах приводит к ослаблению эффекта дестабилизации макромолекул ДНК, наблюдаемого при относительно малых концентрациях аминокислот, и к усилению их стабилизирующего действия при относительно высоких концентрациях (>1,5-2M). Дестабилизация может быть обусловлена, скорее всего, тремя обстоятельствами. Во-первых, взаимодействием положительно заряженных аминных групп аминокислот с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, сопровождающимся частичным вытеснением ионов Na⁺, в результате чего ослабляется экранизация взаимного отталкивания фосфатных

групп. Во-вторых, по достижении стехиометрического соотношения ДНК-аминокислота свободные (несвязанные) аминокислоты, подобно некоторым органическим соединениям, воздействуют на пространственную структуру воды, гидратированной на ДНК, изменяя межмолекулярные взаимодействия между ними и тем самым понижая стабильность ДНК. Наконец, в-третьих,

дестабилизация структуры может быть результатом прямого взаимодействия аминокислот с азотистыми основаниями. Чем же в основном обусловлена дестабилизация ДНК?

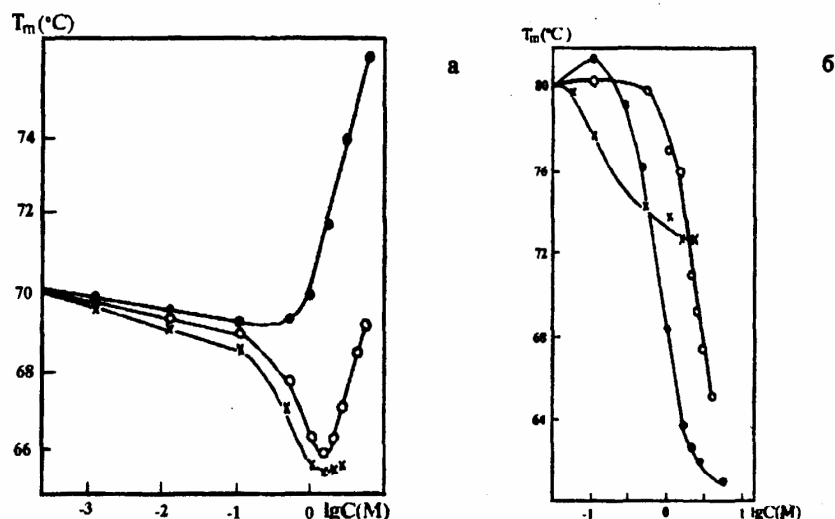


Рис. 3. Зависимость температуры плавления ДНК от логарифма концентрации аминокислоты в отсутствие экранировки фосфатных групп (а) и при их полной экранировке ионами Mg^{2+} ($[Mg^{2+}] = 6 \cdot 10^{-4} M$) (б): x - глицин, o - β -аланин, ● - γ -АМК.

Анализ результатов, полученных в работах [45, 46], позволяет однозначно утверждать, что глицин, β -аланин и γ -АМК непосредственно не контактируют с азотистыми основаниями. Таким образом, эффект дестабилизации ДНК не может быть обусловлен прямым взаимодействием аминокислот с азотистыми основаниями.

Сложный характер зависимости термостабильности от ионной силы раствора указывает на возможность реализации электростатического механизма дестабилизации ДНК в присутствии обсуждаемых аминокислот. Естественно думать, что при малых концентрациях аминокислот происходит взаимодействие положительно заряженных аминных групп цвиттерионов с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Однако решающий вклад в уменьшение термостабильности вносит действие аминокислот на пространственную структуру воды, непосредственно прилегающей к ДНК. Иными словами, эти аминокислоты, подобно некоторым органическим растворителям, вызывают нарушение пространственной структуры воды, непосредственно прилегающей к макромолекулам ДНК, стимулируя тем самым изменения межмолекулярных взаимодействий ДНК-растворитель. Характер изменений этих взаимодействий зависит от длины углеводородного радикала аминокислоты и степени ее разветвленности [21].

Обратимся теперь к эффекту увеличения термостабильности ДНК при высоких концентрациях аминокислоты. Известно, что стабильность ДНК

зависит от ионной силы раствора (температура денатурации линейно растет с ростом логарифма ионной силы). С учетом практически линейной зависимости T_m от логарифма концентрации аминокислот, можно убедиться, что

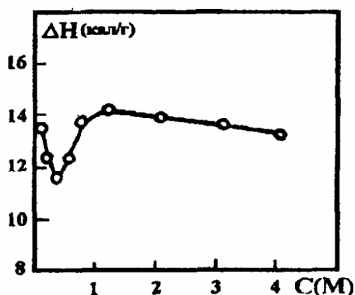


Рис. 4. Зависимость энтальпии перехода спираль-клубок ДНК от концентрации β -аланина.

образом, чем ниже концентрация противоионов в растворе, тем энтропийно более выгоден процесс плавления. При взаимодействии аминокислот с ДНК энтропия смешения противоионов и цвиттерионов будет зависеть не только от концентрации первых в растворе, но и вторых. А это значит, что чем выше концентрация аминокислот в растворе, тем энтропийно менее выгоден процесс плавления ДНК и, следовательно, выше ее термостабильность.

Конформация. Известно, что в стимулировании конформационных переходов молекул ДНК определенную роль играет изменение свойств растворителя. Действительно, основным фактором, определяющим конформационное состояние ДНК, является активность молекул воды, которая чрезвычайно чувствительна к составу растворителя [3, 50]. Весьма ценную и определенную информацию об особенностях конформационного состояния ДНК можно получить на основе исследований макромолекул ДНК в условиях частичной их дегидратации [51] и изменения полярности среды [1, 2]. С этой целью в работе [46] методом КД проведено детальное исследование конформационных превращений ДНК в водных растворах глицина, β -аланина и γ -АМК, что позволяет выяснить роль дегидратации ДНК в стимулировании конформационных переходов в ней. Изменение спектров КД ДНК в присутствии глицина, β -аланина и γ -АМК свидетельствует, что в области концентраций аминокислот, стабилизирующих ДНК, происходят конформационные изменения макромолекул в пределах В-семейства форм (см., напр., рис. 5).

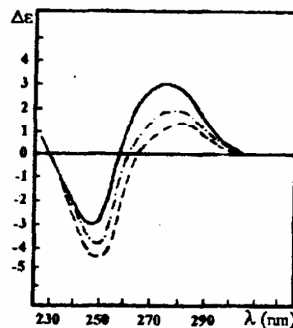


Рис. 5. Спектры КД ДНК тимуса тельца в присутствии мочевины и β -аланина в 0,1SSC*: (—) — чистая ДНК, (- · -) — ДНК+4M мочевины, (- -) — ДНК+4M β -аланина.

* 1 SSC = 0,15M NaCl + 0,015M Na цитрат.

Практически полное совпадение микрокалориметрических (высокие концентрации) и спектрофотометрических дифференциальных (низкие на порядок концентрации) кривых плавления (рис. 6) показывает, что конформационные изменения

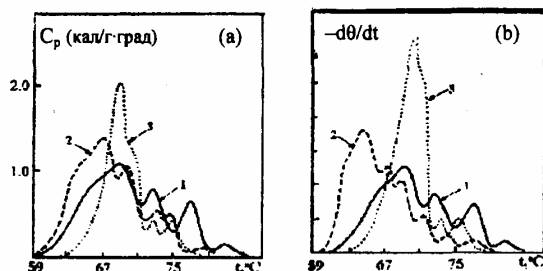


Рис. 6. Микрокалориметрические (а) и спектрофотометрические (б) дифференциальные кривые плавления ДНК тимуса теленка в присутствии различных концентраций β-аланина в 0,1 SSC: 1 – 0, 2 – 1,6M, 3 – 5M.

ДНК, реализуемые в водных растворах β-аланина (аналогичная картина наблюдается и в случаях глицина, и γ-АМК), не связаны с межмолекулярной и внутримолекулярной агрегациями.

Из полученных результатов следует, что конформационные состояния ДНК в водных растворах глицина, а также редких аминокислот β-аланина и γ-АМК обусловлены как прямым взаимодействием аминокислот с ДНК (электростатическое взаимодействие положительно заряженных аминных групп аминокислот с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК при малых концентрациях веществ), так и косвенным воздействием на структуру макромолекулы путем изменения структуры и свойств воды.

Рассмотрим подробные конформационные изменения ДНК в области малых (10^{-3} – $10^{-1}M$) и высоких концентраций (1–5M) лигандов. Как было сказано выше, при относительно малых концентрациях аминокислот образуются комплексы ДНК–цвиттерионы, в результате чего происходит частичное вытеснение связанных с ДНК ионов и нарушение пространственной структуры в непосредственно прилегающем к ДНК слое воды (гидратная вода) [45]. Последнее приводит к изменениям в спектрах КД ДНК (рис. 7). Т.е., с увеличением содержания этих веществ в интервале 10^{-3} – $10^{-1}M$ при неизменной концентрации ДНК в растворе происходит увеличение амплитуды положительной полосы КД $\Delta\epsilon_{276}$.

Следует отметить, что при тех же концентрациях аминокислот происходит резкое падение энthalпии перехода спираль–клубок ДНК [25], обусловленное удалением части молекул воды, принимающих участие в постро-

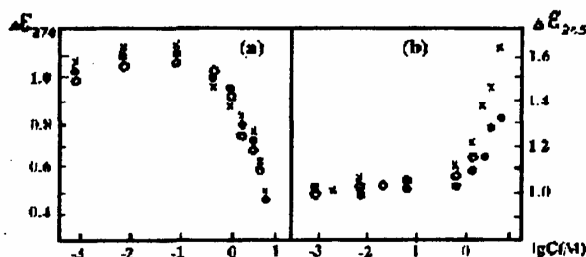


Рис. 7. Зависимость относительной интенсивности полос $\Delta\epsilon_{276}$ (а) и $\Delta\epsilon_{245}$ (б) спектров КД ДНК тимуса теленка от логарифма концентрации аминокислоты в 0,1 SSC: ● – глицин, ○ – β-аланин, × – γ-АМК.

ениям в спектрах КД ДНК (рис. 7). Т.е., с увеличением содержания этих веществ в интервале 10^{-3} – $10^{-1}M$ при неизменной концентрации ДНК в растворе происходит увеличение амплитуды положительной полосы КД $\Delta\epsilon_{276}$.

Следует отметить, что при тех же концентрациях аминокислот происходит резкое падение энthalпии перехода спираль–клубок ДНК [25], обусловленное удалением части молекул воды, принимающих участие в постро-

ении гидратной оболочки исходной ДНК. При высоких же концентрациях аминокислот в спектрах КД происходят иные изменения – монотонно уменьшается интенсивность полосы $\Delta\epsilon_{276}$ и увеличивается отрицательная полоса $\Delta\epsilon_{276}$ (рис. 7). Мы склонны полагать, что конформационные изменения ДНК в водных растворах глицина, β -аланина и γ -АМК при высоких концентрациях обусловлены скорее всего их структуроразрушающим влиянием на воду.

Переходы в третичной и вторичной структурах ДНК зависят от длины углеводородного радикала молекулы и степени его разветвленности. А, как было показано в работе [26], в условиях полной экранировки фосфатных групп исследованные аминокислоты ведут себя подобно некоторым органическим веществам. Они дестабилизируют макромолекулу ДНК, нарушая пространственную структуру воды в непосредственной близости от макромолекул [52]. Таким образом, в исследуемом ряду аминокислот ($H_2N-(CH_2)_n-COOH$) наибольшую длину имеет γ -АМК и именно он является лучшим структуроразрушающим агентом.

б) Ионы металлов первого переходного ряда. Протекающие в организме ферментативные реакции, как правило, катализируются ионами двухвалентных металлов. В активном центре любого фермента обязательно присутствуют ионы определенного металла, их наличие необходимо для нормального протекания процессов репликации и транскрипции. Ионы переходных металлов проявляют сильное мутагенное и канцерогенное действие. Ионы металлов также играют значительную роль в функционировании нуклеиновых кислот, поэтому любые данные о физических свойствах комплексов ДНК с металлами могут представлять несомненный интерес для понимания молекулярно-биологических механизмов функционирования нуклеиновых кислот (см., напр., [53]).

Современные данные о местах предпочтительного связывания нуклеиновых кислот с ионами металлов основываются на изучении кристаллических структур металл-нуклеотидных комплексов методом рентгеноструктурного анализа, а также спектров ЯМР и ЭПР растворов солей металлов с нуклеотидами [53]. На нуклеотидах имеется три типа центров связывания для ионов металлов: основание, фосфат и рибоза (или дезоксирибоза). Рибоза считается слабым лигандом и поэтому как потенциальный центр связывания не представляет интереса. Фосфатная группа из-за наличия в ней атомов кислорода, несущих значительный отрицательный заряд, является сильным лигандом по отношению к ионам щелочных и щелочно-земельных, а также переходных металлов. И наконец, азотистые основания являются сильным лигандом только для ионов переходных металлов.

На фосфатных группах имеется одно место связывания, характеризующееся высокой плотностью отрицательного заряда, на азотистых основаниях предпочтительными для связывания с ионами металлов являются места с избыточной плотностью заряда, т.е. места, обладающие большей основностью (схема 1).

Согласно схеме 1, предложенной в работе [54], потенциальные места связывания ионов металлов с азотистыми основаниями следующие (в скобках

приведены величины избыточной плотности заряда данного атома):
 на гуанине – N7 (0,63), N1 (0,55), O6 и NH₂ (0,43);
 на аденине – N7 (0,52), N1 (0,53), NH₂ (0,43);
 на цитозине – N3 (0,66), O2 и NH₂ (0,43);
 на тимине – N3 (0,32), O4 (0,35), O2 (0,33).

Однако ведущую роль в процессе комплексообразования ДНК с ионами металлов играет не столько основность, сколько стерические факторы конкретного места связывания. Двухвалентные ионы переходных металлов образуют наиболее устойчивые комплексы с положением N7 пуриновых нуклеотидов (особенно гуанина), причем связь N7–металл значительно более сильная, чем это следует из простого рассмотрения основности указанного места [53–56].

Ионы переходных металлов, благодаря своей незавершенной 3d-электронной конфигурации, могут образовывать с атомами донора координационные связи. Кристаллографические данные, полученные для ионов Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ и Ni²⁺, обнаруживают хелатообразное связывание ионов с N7 гуанина и кислородом фосфатной группы. Обнаружено также комплексообразование ионов переходных металлов с положениями N1 гуанина и аденина и O6 гуанина, однако устойчивость полученных

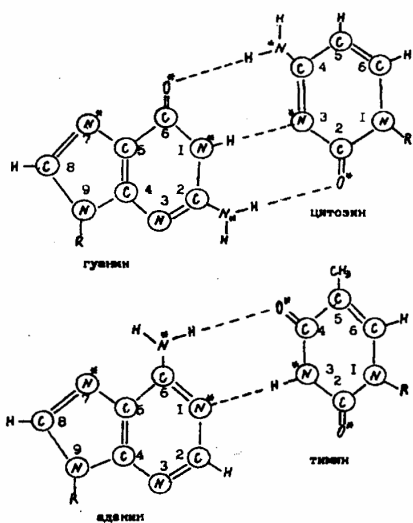


Схема 1. Схема комплементарных АТ- и ГЦ-нуклеотидных пар. Звездочкой указаны места, обладающие высокой плотностью заряда. R – места присоединения оснований к фуранозному кольцу.

комплексов значительно ниже, чем при связывании с N7 пуриновых нуклеотидов [53].

В пиримидиновых нуклеотидах (цитозине и тимине) положение N3 является наиболее предпочтительным местом связывания двухвалентных ионов переходных металлов. Связывание же с положением O2 значительно слабее. Исключение составляют ионы Mn²⁺, предпочитающие связываться с O2 атомом цитозина [56].

В литературе обсуждается также вопрос о возможности связывания ионов металлов с аминогруппами оснований. Однако показано, что они являются плохими лигандами по той причине, что неподеленная пара π-электронов делокализована и поэтому не способна к связыванию с ионом металла. Но после депротонирования они могут участвовать в связывании металла с нуклеотидом [53]. Следовательно, активность места на нуклеотиде зависит от внешних условий, в частности от рН среды, концентрации ионов, температуры и т.д.

В зависимости от того, с каким именно местом на нуклеотиде связывается ион, структура и, следовательно, физические свойства полученных комплексов будут сильно различаться.

Весьма ценную информацию о структуре и свойствах комплексов ДНК–металл можно получить, если исследовать их температурное плавление [38, 57] и конформационные переходы в ДНК, вызываемые ионами металлов [41, 58, 59]. Все предложенные в отмеченных работах механизмы связывания ионов металлов (в частности ионов переходных металлов) предполагают избирательное связывание последних с определенными нуклеотидными парами.

Конформация. Исследование спектров КД комплексов ДНК с ионами переходных металлов показывает, что при комнатной температуре под влиянием ионов ДНК переходит в более закрученную по сравнению с В-формой «С-подобную» форму в пределах В-семейства [60–62]. Эффект достигает насыщения при относительной концентрации ионов Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} к нуклеотиду, равной $0,5M/P$. Это связано с тем, что при указанных концентрациях положительно заряженные ионы двухвалентных металлов более эффективно, чем вносимые с буфером одновалентные ионы Na^+ , экранируют отрицательный заряд фосфатных групп ДНК, причем для полной экранировки достаточен 1 ион на 2 фосфатные группы. При более высоких концентрациях ионов переходных металлов, когда весь заряд фосфатных групп практически ими экранирован, они начинают взаимодействовать с основаниями, что, естественно, приводит к ослаблению спирали ДНК.

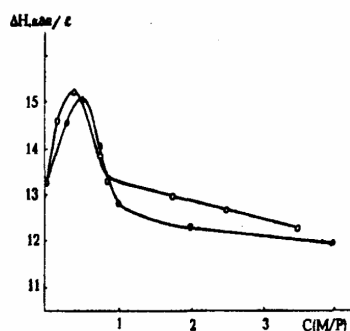


Рис. 8. Зависимость энтальпии перехода спираль-клубок ДНК тимуса телят от концентрации ионов Mn^{2+} (о) и Co^{2+} (•). Эксперименты проводились в 0,1 SSC, ионная сила $[Na^+]=0,2$.

В пользу такого заключения свидетельствуют также микрокалориметрические результаты [59]: до концентраций $\sim 0,5M/P$ энтальпия плавления ДНК увеличивается, а при более высоких (до $4M/P$) — уменьшается (рис. 8).

Переход спираль-клубок. На рис. 9 приведены дифференциальные кривые плавления ДНК тимуса телят в $10^{-3}M NaCl$ в присутствии различных концентраций ионов Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} . Из графиков рисунка следует, что в зависимости от концентрации ионов происходит значительное изменение формы кривой плавления. Поскольку наиболее сильное изменение кривой плавления происходит в высокотемпературной части (она сдвигается в сторону низких температур), то можно заключить, что имеет место преимущественная дестабилизация ГЦ-пар при концентрации ионов $\sim 1M/P$. К такому же заключению приводит анализ зависимостей T_m и ΔT ДНК с разным ГЦ-содержанием от концентрации добавляемого иона (рис. 10). Из рис. 10 следует, что вплоть до концентраций ионов Mn^{2+} , Co^{2+} , и Ni^{2+} $\sim 1M/P$ термостабильность

всех ДНК растет. Для ДНК *M. Luteus* рост термостабильности наиболее значителен и продолжается до концентрации 0,5M/P. При этих концентрациях ионы переходных металлов, подобно ионам щелочных металлов, экранируют отрицательно заряженные фосфатные группы [11, 27, 38, 54].

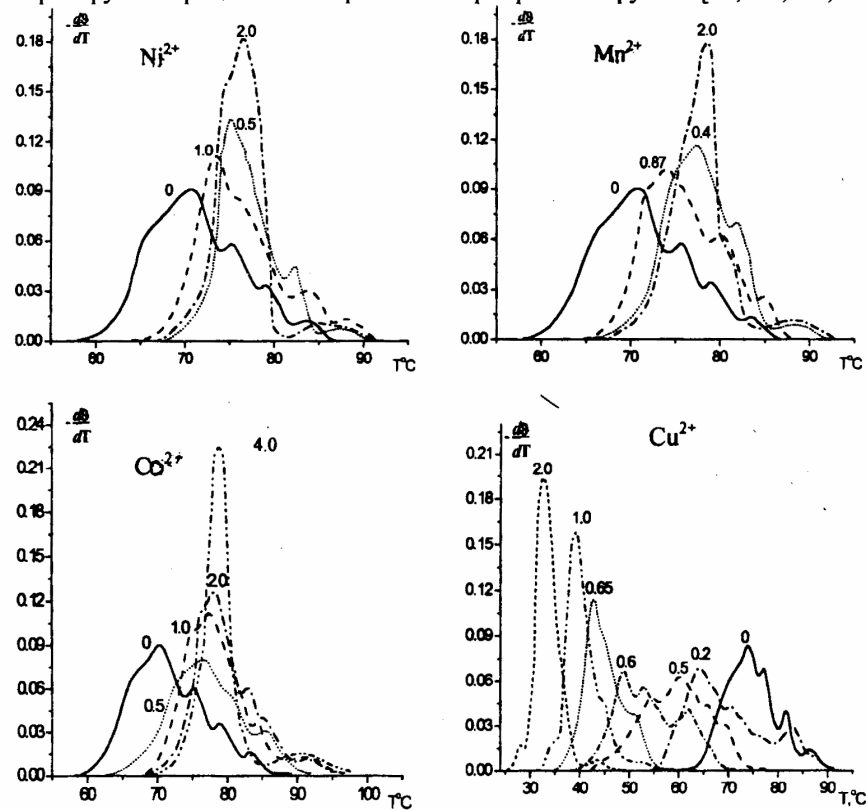


Рис. 9. Дифференциальные кривые плавления ДНК тимуса теленка при различных концентрациях ионов Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} . Цифры у кривых – концентрации ионов в молях на моль нуклеотидов (M/P).

Далее, с повышением концентрации этих ионов термостабильность ДНК уменьшается. Особенно значительное уменьшение наблюдается для ДНК с высоким ГЦ-содержанием. Для ДНК же с высоким АТ-содержанием (*Cl. Perfringens*) термостабильность практически не меняется до концентрации 1M/P. При таком характере изменения термостабильности ДНК можно было ожидать инверсии относительных термостабильностей АТ- и ГЦ-пар. Однако это явление наблюдается только в случае ионов Cu^{2+} . Следовательно, при стехиометрических концентрациях с ростом количества ионов Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} наблюдается лишь тенденция к выравниванию термостабильностей АТ- и ГЦ-богатых ДНК. Причем термостабильность ГЦ-богатой ДНК остается выше АТ-богатой при всех исследованных концентрациях ионов. По эффективности сближения термостабильностей АТ- и ГЦ-пар ДНК эти ионы можно

расположить в ряд $Mn^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}$.

Интервал же плавления ДНК уменьшается при всех концентрациях добавляемых ионов (рис. 10). Только при концентрациях $1M/P$ он резко сужается, а при более высоких – сужение замедляется. Для ДНК с высоким ГЦ-содержанием минимальное значение интервала плавления $1,7-2,0^{\circ}C$, а для ДНК с высоким АТ-содержанием он сужается до $0,6-0,7^{\circ}C$. Этот эффект является результатом избирательного взаимодействия ионов с ГЦ-нуклеотидными парами [63, 64].

Поскольку при одних и тех же концентрациях ионов металлов на долю ГЦ-пар в АТ-богатых ДНК приходится больше ионов, чем в ГЦ-богатых ДНК, то их действие на первые будет эффективнее (интервал плавления уменьшается сильнее в АТ-богатых ДНК, чем в ГЦ-богатых).

Особый интерес представляют ионы Cu^{2+} . Достаточно низкие их концентрации ($0,65-2,0M/P$) вызывают инверсию относительных термоста-

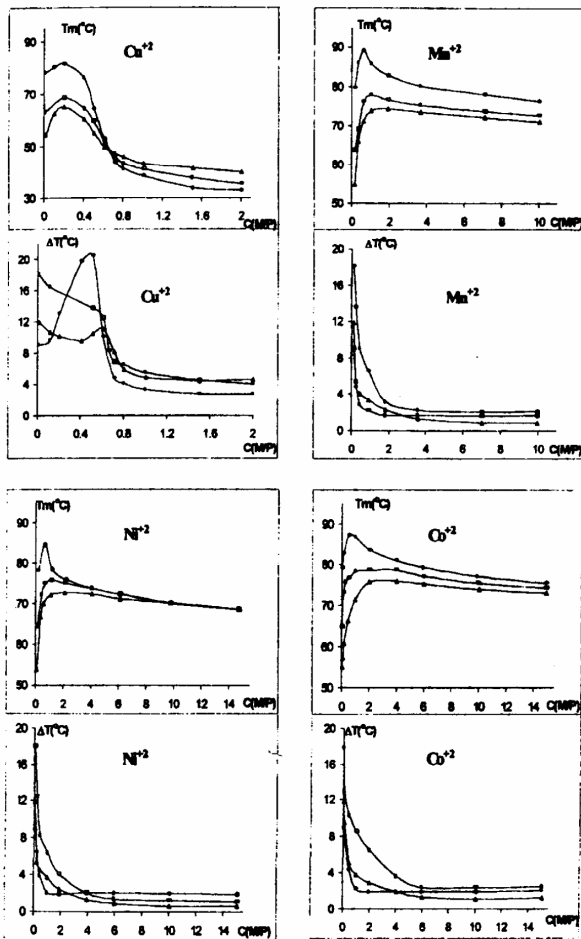


Рис. 10. Параметры перехода спираль-клубок ДНК различных источников (□ – тимуса телянка, ● – *M. luteus*, Δ – *Cl. perfringens*) в присутствии ионов различных металлов.

бильностей АТ- и ГЦ-пар ДНК. Интервал же плавления всех ДНК при очень низких концентрациях ионов Cu^{2+} ($<0,5M/P$) ведет себя несколько anomalно. Особенно сильно это наблюдается у ГЦ-богатой ДНК. До концентраций ионов $Cu^{2+} < 0,5M/P$ интервал плавления этой ДНК растет до $20^{\circ}C$. При дальнейшем повышении концентрации ионов Cu^{2+} интервал плавления всех типов ДНК изменяется также, как и в случае ионов Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} (рис. 10).

На дифференциальных кривых плавления ДНК тимуса теленка (рис. 9) при наличии до 0,5–0,6M/P ионов Cu^{2+} наблюдается уширение кривой, сопровождаемое тенденцией к появлению двухфазности плавления. При более высоких концентрациях ($>0,65M/P$) ионов Cu^{2+} дифференциальная кривая резко сужается, причем происходит слияние отдельных пиков в один узкий реперный, как и в случае остальных исследованных нами металлов. Таким образом, при этих концентрациях ионов Cu^{2+} интервал плавления сужается, однако остается все же достаточно большим ($\sim 3,5\text{--}4^{\circ}\text{C}$) [65].

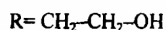
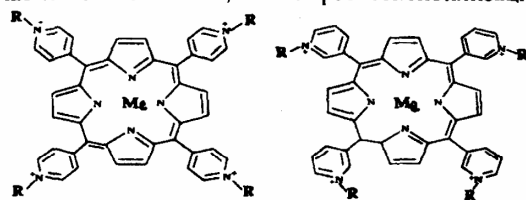
При обратимом связывании лигандов известны несколько причин, приводящих к уширению и двухступенчатости кривых плавления: 1) кооперативный характер взаимодействия лигандов с ДНК [66], 2) сильные отличия в значениях констант связывания лиганда со спиральными и расплавленными участками ДНК [66], 3) внутримолекулярная агрегация ДНК [7], 4) наличие примесных ионов [67]. На первый взгляд, наиболее вероятной является первая причина, поскольку известно, что ионы Cu^{2+} кооперативно связываются с одноцепочечными полинуклеотидами polyA и polyC [38]. Однако расчеты показывают, что при столь низких концентрациях вклад кооперативности связывания Cu^{2+} с ДНК незначителен. Как показано в работах [32, 62], при низких степенях заполнения ДНК ионами меди отличия в константах связывания ионов меди со спиральными и расплавленными участками могут привести к перераспределению ионов с расплавленных на спиральные участки в процессе плавления ДНК и, следовательно, могут стать одной из причин уширения кривой. Что касается третьей причины, то обычно образование агрегатов в ДНК происходит при значительно более высоких концентрациях лигандов. Другой вероятной причиной уширения кривой плавления ДНК в присутствии ионов Cu^{2+} может быть наличие в растворе примесных ионов, действие которых не может не проявляться при столь низких концентрациях ионов Cu^{2+} .

в) Порфирины и металлопорфирины. Рассмотрение порфириновых комплексов в качестве обратимо связывающихся лигандов обусловлено тем, что эти соединения способны реализовывать совершенно особый тип обратимого связывания с ДНК – интеркаляцию.

Порфирины и металлопорфирины представляют собой плоские циклические органические соединения, основу которых составляет порфириновое ядро. В центре ядра может находиться металл, связанный с азотами ядра четырьмя или более координационными связями. Обычно это один из металлов первого переходного ряда, но возможны также комплексы с более тяжелыми металлами, например, Ag, Au, Pd, Pt и т.д. Помимо металла, порфирины могут отличаться также типом и местоположением бокового радикала (см., напр., схему 2).

Порфирины и особенно их металлопроизводные весьма распространены в природе. Они входят в состав биологических соединений (гемоглобин, хлорофилл, витамины группы В и т.д.). Как природные, так и синтезированные порфирины относятся к разряду интенсивно изучаемых соединений, химические и фотохимические свойства которых широко используются в

медицине и биологии [68–72]. Благодаря способности избирательно накапливаться в опухолевых клетках, они применяются в онкологической практике в качестве диагностического теста обнаружения формы опухоли [70]. Это их качество так же, как и фотосенсибилизационные свойства [73], успешно



Me=2H	TOEPyP(4)	Me=2H	TOEPyP(3)
Me=Cu	CuTOEPyP(4)	Me=Cu	CuTOEPyP(3)
Me=Co	CoTOEPyP(4)	Me=Co	CoTOEPyP(3)
Me=Zn	ZnTOEPyP(4)	Me=Zn	ZnTOEPyP(3)
Me=Ni	NiTOEPyP(4)	Me=Ni	NiTOEPyP(3)

Схема 2. Структурные формулы мезо-тетра (4-N-оксипиридил) порфирина (ТОЕРуР(4)) и его 3-N-замещенного аналога (ТОЕРуР(3)), а также их металлокомплексов (MeТОЕРуР(4), MeТОЕРуР(3)), где Me = Co, Cu, Ni, Zn). На схеме справа находятся порфирины с боковыми радикалами, присоединенными к 3N-положению пиридилового кольца, слева – в 4N-положении.

используются в фотодинамической терапии опухолей [70–72]. Хорошо известны также противовирусные, противогрибковые и антибактериальные свойства порфиринов [68, 69]. Поэтому многие исследователи проявляют интерес к синтезу новых порфиринов с целью создания лекарственных средств на их основе [71, 74]. Например, введенные на схеме 2 порфирины, синтезированные на кафедре фармакологической химии Ереванского медицинского гос. университета по методу [74],

обладают противогрибковыми и антибактериальными свойствами. Хотя медико-биологическое действие синтезированных порфиринов и определено, однако механизм их взаимодействий с ДНК практически в каждом конкретном случае требует индивидуального изучения.

Установлено, что порфирины могут взаимодействовать с ДНК тремя механизмами [75–80] (рис. 11):

- **интеркаляцией**, при которой плоскость молекулы порфирина вклинивается между соседними парами оснований ДНК, при этом пиридиловые группы оказываются торчащими в желобках – по два в каждом (рис. 11, а);
 - **внешним упорядоченным желобковым**. При этом способе взаимодействия происходит образование на ДНК параллельной упаковки плоскостей порфиринов друг над другом (стэкинг-взаимодействия порфиринов). Взаимодействия происходят в основном в малом желобке ДНК, но не исключено – и в большом (рис. 11, в). Основания при этом располагаются в желобках под некоторым углом к оси спирали. В частности для ТМРуР(4) этот угол составляет 55° (на рисунке наклон не показан);
 - **внешним неупорядоченным желобковым**, при котором молекулы порфирина располагаются в большом желобке ДНК так, что плоскость порфиринового кольца оказывается параллельной оси ее спирали (рис. 11, б).
- Оба типа желобкового взаимодействия происходят при непосредственном участии отрицательно заряженных фосфатных групп.

Все имеющиеся на сегодняшний день результаты по взаимодействиям

ДНК–порфирин получены в основном для одного водорастворимого порфирина – мезо-тетра-(метилпиридил)порфирина (ТМРур). Однако известно, что механизм связывания с ДНК во многом зависит от типа бокового радикала. Например, водорастворимый мезо-тетра-(триметилпиридил)порфирин

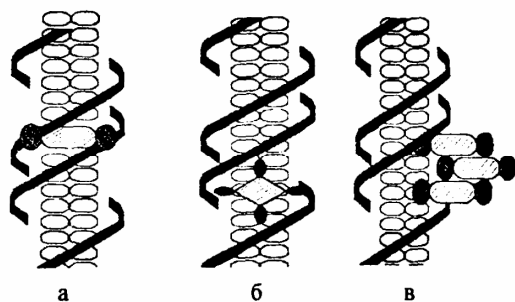


Рис. 11. Схематическая диаграмма, иллюстрирующая механизмы связывания комплексов ДНК с ТМРур(4): а) – интеркаляция, б) – внешнее неупорядоченное желобковое связывание и в) – внешнее упорядоченное желобковое связывание. Рисунок взят из работы [80].

(ТМАР) из-за наличия трех метильных групп в боковом радикале (заметьте, что в ТМРур одна метильная группа) стерически не способен интеркалировать в ДНК и связывается с ней только внешним способом [69, 78]. В литературе имеется очень мало работ по изучению связывания с ДНК порфиринов с различными боковыми радикалами. Поэтому нашей

целью было изучить, как влияет удлинение бокового радикала пиридилового кольца порфиринов (схема 1) на механизмы связывания с ДНК.

Спектры кругового дихроизма. Наблюдаемые при внешнем и внутреннем (интеркаляция) упорядоченном связывании порфиринов межплоскостные стекинг-взаимодействия между связанными на ДНК порфиринами приводят к нетривиальному результату – на спектрах кругового дихроизма комплексов ДНК–порфирин появляется вторая полоса дихроичного поглощения [75, 76, 78, 81]. Известно, что комплексы ДНК с мезо-тетра-(4N-метилпиридил)порфиринами (ТМРур(4)) характеризуются двумя полосами КД:

1) 220–310нм, которая совпадает с полосой естественного КД ДНК;

2) 400–470нм – полоса индуцированного порфиринами КД, которая совпадает с одной из полос поглощения порфиринов (полосой Core), где ДНК прозрачна.

Закономерно предположить, что полоса индуцированного КД в видимой области обусловлена только упаковкой порфиринов на ДНК, поскольку порфирины, являющиеся плоскими, симметричными соединениями, естественной оптической активностью не обладают и имеют нулевой дихроизм во всей области электронных переходов.

1. *Порфирины.* На рис. 12 приведены КД-спектры комплексов ДНК с ТМРур(4) и ТМРур(3). Увеличение относительной концентрации ($r = C_{\text{порф}} / C_{\text{пар осн. ДНК}}$) ТМРур(4) (рис. 12, а) приводит к расщеплению положительной полосы $\Delta\epsilon_{276}$ ДНК на две полосы, тогда как добавление ТМРур(3) к ДНК (рис. 12, б) – лишь к небольшому уменьшению ее интенсивности, практически не изменяя интенсивности отрицательного пика (B-C-подобный переход). Следовательно, различия в местах присоединения бокового радикала на пиридиловом кольце порфирина оказываются весьма существенными в

плане воздействия данных порфиринов на конформацию ДНК [82, 83].

В видимой области оба комплекса имеют отрицательный КД (квадратики в верхнем правом углу рис. 12), следовательно, согласно [75, 76, 81],

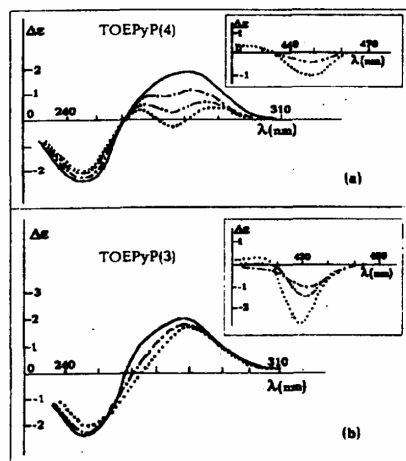


Рис. 12. Спектры кругового дихроизма комплексов ДНК с ТОЕРуР(4) (а) и ТОЕРуР(3) (б) при различных относительных концентрациях порфирина: (—) — $\Gamma=0$; (-·-) — $\Gamma=0,077$; (-·-·-) — $\Gamma=0,15$; (···) — $\Gamma=0,77$.

порфиринами посредством интеркаляции и предполагает только внешнее связывание порфиринов на поверхности полимера. Соответствующие спектры КД приведены на рис. 13.

В видимой области спектры ТОЕРуР(4) имеют только положительную полосу при $\lambda=435\text{nm}$. Однако с увеличением концентрации порфирина в комплексах начинает вырисовываться и отрицательная полоса при $\lambda=425\text{nm}$. При низких концентрациях порфирина спектр КД ТОЕРуР(3)–ДНК комплекса в видимой области почти консервативен. Однако с увеличением концентрации порфирина положительная полоса растет в несколько раз сильнее, чем отрицательная.

В УФ-области наблюдается радикальное изменение спектров: с увеличением концентрации порфиринов положительная полоса $\lambda=310\text{--}260\text{nm}$ меняет знак с «+» на «-». Сравнивая изме-

можно утверждать, что эти порфирины предпочитают интеркаляционный способ связывания друг с другом. Этот способ реализуется в ГЦ-богатых участках ДНК, а в АТ-богатых – взаимодействие с порфиринами происходит посредством внешнего желобкового связывания [69, 78, 79]. Интересный результат получается в комплексах порфирины– $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ ($\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ – это синтетическая двуспиральная ДНК длиной примерно 200 пар нуклеотидов, каждая нитка которой состоит из альтернирующей АТ-последовательности). Поскольку расстояние между соседними вдоль цепи АТ-парами меньше вертикальных размеров порфиринов, то этот полимер стерически не способен взаимодействовать с пор-

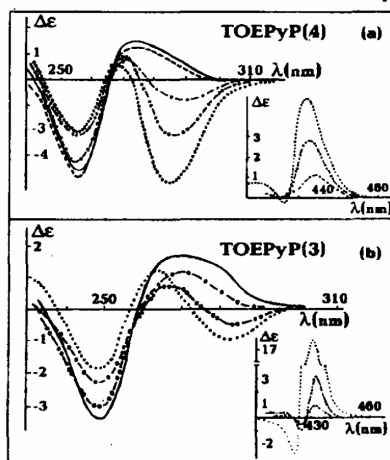


Рис. 13. Спектры кругового дихроизма комплексов $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ с ТОЕРуР(4) (а) и ТОЕРуР(3) (б) при различных относительных концентрациях порфирина: (—) — $\Gamma=0$; (-·-) — $\Gamma=0,013$; (-·-·-) — $\Gamma=0,066$; (-·-·-) — $\Gamma=0,13$; (···) — $\Gamma=0,66$.

нения в УФ-области КД-спектра комплексов порфиринов с ДНК (рис. 12, а) и poly(dA-dT)₂ (рис. 13), можем прийти к выводу, что характерное расщепление полосы $\Delta\epsilon_{276}$ является признаком внешнего связывания порфиринов с АТ-богатыми участками ДНК. Приведенные выводы находятся в хорошем соответствии с результатами работ [78, 84], где показано, что порфирины ТМРур при высоких ионных силах образуют достаточно протяженные ассоциаты (агрегаты) друг с другом на поверхности poly(dA-dT)₂. Это на спектрах КД проявляется в виде аномально сильных полос в видимой области. Не исключено, что это является следствием образования порфиринами жидкокристаллических структур на полимере как на матрице.

2. *Металлопорфирины.* На рис. 14 и 15 приведены спектры КД ДНК с Zn-, Cu-содержащими металлопорфиринами, синтезированными на базе

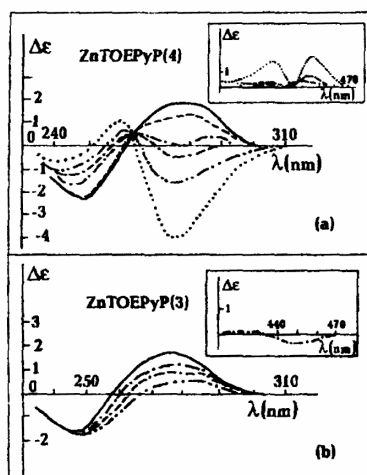


Рис. 14. Спектры кругового дихроизма комплексов ДНК с ZnTOEPyP(4) (а) и ZnTOEPyP(3) (б) при различных относительных концентрациях порфирина: (—) — $r=0$; (- - -) — $r=0,03$; (- · -) — $r=0,077$; (· - ·) — $r=0,11$; (- · ·) — $r=0,15$; (···) — $r=0,77$.

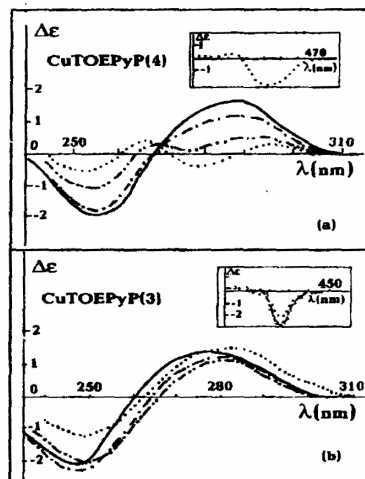


Рис. 15. Спектры кругового дихроизма комплексов ДНК с CuTOEPyP(4) (а) и CuTOEPyP(3) (б) при различных относительных концентрациях порфирина: (—) — $r=0$; (- · -) — $r=0,027$; (- · ·) — $r=0,08$; (···) — $r=0,77$; (- Δ -) — $r=1,35$.

ТОЕРур(4) и ТОЕРур(3) безметалльных порфиринов. Как видим, при наличии металлопорфиринов, синтезированных на базе ТОЕРур(4), в УФ-области спектров КД наблюдается расщепление пика естественного КД ДНК при $\lambda=275$ нм, тогда как для металлопорфиринов MeTOEPyP(3) происходит лишь небольшое уменьшение этой полосы. Таким образом, по виду КД-спектров в УФ-области комплексов ДНК с металлопорфиринами можно однозначно судить, на базе какого безметалльного порфирина они получены [82].

Сильный эффект расщепления полосы $\lambda=275$ нм наблюдается при наличии в растворе ZnTOEPyP(4) (рис. 14), что приводит к изменению знака

этой полосы с «+» на «-», как это имеет место для Z-формы или агрегированной $\Psi_{(-)}$ -формы ДНК [7, 8]. Однако подобное изменение формы ДНК может быть не единственным результатом ее взаимодействия с порфиринами. Возможна также и другая причина. Поскольку сами порфирины имеют полосу поглощения в УФ-области, совпадающую с полосой поглощения ДНК, не исключено, что в результате внешней упаковки порфиринов на ДНК образующиеся достаточно протяженные порфириновые структуры приобретают отрицательный индуцированный КД в полосе $\lambda=260-310\text{нм}$, который в сумме с положительным вращением ДНК в этой области дает расщепление полосы.

Образование достаточно протяженных порфириновых структур на поверхности ДНК весьма вероятно. Это следует также из экспериментов по струйному дихроизму ДНК в присутствии $\text{TMРyP}(4)$ и его металлокомплексов. Действительно, при внешнем желобковом связывании плоскости порфиринового кольца располагаются не параллельно или перпендикулярно оси спирали, а под углом к ней [85, 86]. В частности для $\text{TMРyP}(4)$ этот угол составляет 55° , для $\text{ZnTMРyP}(4) - 65^\circ$, а для $\text{CoTMРyP}(4) - 45^\circ$.

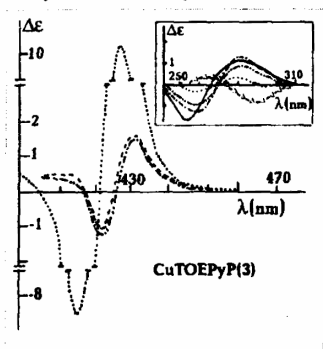


Рис. 16. Спектры кругового дихроизма комплексов poly(dA-dT)_2 с $\text{CuTOEPyP}(3)$ при различных относительных концентрациях порфирина: (—) — $r=0$; (- · - ·) — $r=0,022$; (- · · -) — $r=0,11$; (- - -) — $r=0,22$; (····) — $r=1,1$; (- Δ -) — $r=3,0$.

По знаку индуцированного КД в видимой области можно утверждать, что $\text{ZnTOEPyP}(4)$, $\text{ZnTOEPyP}(3)$ (рис. 14) и $\text{CoTOEPyP}(4)$, $\text{CoTOEPyP}(3)$ реализовывают внешнее упорядоченное связывание с ДНК, а $\text{CuTOEPyP}(4)$, $\text{CuTOEPyP}(3)$ (рис. 15) и $\text{NiTOEPyP}(4)$, $\text{NiTOEPyP}(3)$ связываются с ДНК предпочтительнее интеркаляцией [82].

Теперь рассмотрим вопрос о возможности реализации внешнего связывания для второй группы металлопорфиринов. В связи с этим в работе [82] были исследованы спектры КД комплексов $\text{CuTOEPyP}(3)$ с poly(dA-dT)_2 (рис. 16). Здесь аномально сильные изменения спектров КД в видимой области poly(dA-dT)_2 при повышении содержания $\text{CuTOEPyP}(3)$ говорят о способности этих порфиринов взаимодействовать также с АТ-парами, что происходит только путем внешнего связывания (подобный же эффект наблюдается для $\text{CuTOEPyP}(4)$ и Ni-содержащих порфиринов).

Переход спираль-клубок. В табл. 1 выборочно приведены данные по плавлению ДНК тимуса телят в присутствии различных концентраций порфиринов ($0,001 < r < 0,01$).

Как видно из табл. 1, при $0,001 < r < 0,05$ температура и интервал плавления слабо меняются. При столь низких концентрациях порфирина скорее всего реализуется внешнее связывание. В пользу этого предположения свидетельствует небольшой рост гипохромности (на 1–2%) до $r=0,01$. При концентрациях $0,05 < r < 0,3$ величины T_m и ΔT растут, а при $r > 0,3$ наблюдаются агре-

гационные явления (именно с этих значений начинаются радикальные изменения в спектрах КД комплексов ДНК с порфиринами).

Таблица 1

Температура плавления (T_m), интервал плавления (ΔT) и гипохромный эффект (Δh) полосы $\lambda=260\text{nm}$ ДНК тимуса теленка в комплексе с некоторыми порфиринами. Концентрация ДНК $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ пар нуклеотидов

r	ТОЕРуР(4)			ZnТОЕРуР(4)			CuТОЕРуР(4)		
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$\Delta h, \%$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$\Delta h, \%$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$\Delta h, \%$
0	71,8	9,8	37	71,8	9,8	37	71,8	9,8	37
0,001	72,8	9,3	38	–	–	–	–	–	–
0,002	70,6	9,6	39	71,4	9,9	37	71,9	9,6	37
0,01	71,6	9,4	36	–	–	–	–	–	–
0,02	–	–	–	72,8	11,5	37,5	72,5	10,2	37
0,05	73,3	9,5	34	–	–	–	–	–	–
0,1	75,6	11,8	33	80,6	13,6	39	80,9	12,2	28
>0,3	агрегация								

В табл. 2 приведены данные по плавлению ДНК с различными металлопорфиринами при одной концентрации $r=0,1$.

Таблица 2

Параметры кривых плавления комплексов ДНК тимуса теленка с различными порфиринами/металлопорфиринами ($r=0,1$)

ДНК+порфирин	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$\Delta h, \%$
ДНК без порфирина	71,8	9,8	37
ДНК+ТОЕРуР(4)	75,8	11,8	33
ДНК+ZnТОЕРуР(4)	80,6	13,6	39
ДНК+CoТОЕРуР(4)	78,6	14,3	35
ДНК+CuТОЕРуР(4)	80,9	12,2	28
ДНК+NiТОЕРуР(4)	82,9	13,1	25
ДНК+ТОЕРуР(3)	75,0	14,9	32
ДНК+ZnТОЕРуР(3)	77,2	10,5	40
ДНК+CoТОЕРуР(3)	77,8	11,8	36
ДНК+CuТОЕРуР(3)	72,6	10,4	25
ДНК+NiТОЕРуР(3)	73,0	12,0	30

Как видим из табл. 2, гипохромный эффект (Δh) весьма чувствителен к типу центрального металла. По изменению гипохромного эффекта металлопорфирины можно разделить на две группы:

1) металлокомплексы Zn и Co с обоими типами безметалльных порфиринов, не меняющие (Co) или незначительно увеличивающие (Zn) гипохромный эффект ДНК;

2) металлокомплексы Cu и Ni с этими порфиринами, сильно уменьшающие гипохромный эффект ДНК (для Cu Δh равно 28% и 25%, а для Ni – 25% и 30% для ТОЕРуР(4) и ТОЕРуР(3) соответственно).

Интересные закономерности наблюдаются при концентрации порфирина $r=0,1$. При этой концентрации температура и интервал плавления ДНК

растут для всех типов порфиринов. Однако это увеличение зависит от наличия и типа металла, а также от положения (3N или 4N) бокового радикала на пиридиловом кольце. Действительно, T_m и ΔT изменяются сильнее для ТОЕРуР(4) и его металлокомплексов, чем для ТОЕРуР(3).

Уменьшение гипохромного эффекта Δh полосы $\lambda=260\text{нм}$ ДНК при плавлении комплексов ДНК с некоторыми порфиринами говорит об ослаблении межплоскостных стэкинг-взаимодействий между парами оснований. Это может произойти, если между ними интеркалируют плоскости порфириновых колец. В результате, в местах интеркалирования порфиринов взаимодействия между соседними вдоль цепи парами азотистых оснований ДНК ослабляются. Т.е. для безметалльных, а также Cu- и Ni-содержащих порфиринов реализуется преимущественно интеркаляционный способ связывания. Внешнее же связывание не мешает стэкинг-упаковке пар оснований ДНК друг над другом, и поэтому гипохромный эффект не уменьшается, как это происходит для порфиринов с Zn и Co.

Проведенные исследования комплексов ДНК с порфиринами показали, что механизм их предпочтительного связывания определяется типом центрального металла, точнее его стереометрией.

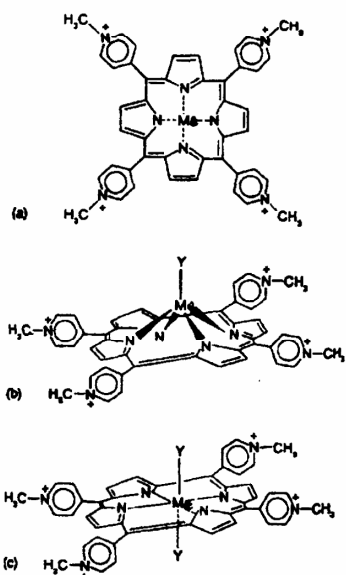


Рис. 17. Способы координирования металлов в металлопорфинах MeTMPyP(4): а) Me=Cu²⁺, б) Me=Zn²⁺, в) Me=Mn³⁺, Ni²⁺. Рисунок взят из работы [78].

А стереометрия металлокомплексов порфиринов очень сильно зависит от такого параметра, как число атомов, с которыми переходной металл координирует [81]. Координационное число для Cu – 4. Cu-содержащий порфирин образует 4 координационные связи с четырьмя атомами азота порфиринового ядра. Вследствие этого, не образуя аксиального лиганда, металл располагается в плоскости порфиринового кольца [69, 81] (рис. 17).

К этой же группе можно отнести Ni, который также не вылезает из плоскости порфиринового кольца, хотя он может образовывать 4- или 6-координационные соединения (во втором случае образует два аксиальных лиганда, расположенных перпендикулярно плоскости порфирина, которые как бы нейтрализуют друг друга). Ni-содержащие порфирины TMPyP, например, способны образовать оба типа координации примерно в равных пропорциях [87].

Координационное число для Zn и Co равно 5 [69, 78]. Порфирины с этими металлами имеют один аксиальный лиганд, расположенный в центре порфиринового ядра перпендикулярно плоскости порфирина, благодаря чему

они выталкиваются из плоскости порфиринового кольца. В результате, эти металлопорфирины не могут вследствие стерических причин интеркалировать между парами оснований ДНК и образуют только внешний тип связывания (рис. 17).

Проведенный анализ показывает [82, 83], что:

- удлинение бокового радикала в пиридиловом кольце принципиально не меняет механизма связывания порфиринов с ДНК. ТОЕРуР(4) и ТОЕРуР(3) связываются с ДНК как посредством образования внешнего, так и внутреннего стэкинга (интеркаляция);

- в зависимости от места прикрепления оксиэтилгруппы в пиридиловом кольце меняется механизм их предпочтительного взаимодействия с ДНК: (4N-оксиэтилпиридил)порфирины предпочитают интеркаляцию в структуру ДНК, но хуже реализовывают внешнее связывание, чем 3N-порфирины;

- механизм взаимодействия порфиринов с ДНК зависит от типа центрального металла. По этому признаку металлопорфирины можно разделить на две группы:

- 1) металлопорфирины, предпочитающие интеркаляционный способ связывания с ДНК, – это Cu- и Ni-содержащие металлопорфирины;

- 2) металлопорфирины, предпочитающие внешнее упорядоченное связывание с ДНК, – это Zn- и Co-содержащие металлопорфирины.

II. Необратимо связывающиеся лиганды

Как уже говорилось выше, необратимое ковалентное связывание лигандов с ДНК приводит к химической модификации ее структуры [85–95]. Известно, что в результате прямого ковалентного связывания с ДНК формируются три основных типа аддуктов:

1. Монофункциональные аддукты, связанные с одним нуклеотидом двойной спирали [90, 96].

2. Внутрицепочечные сшивки, которые формируются путем бифункционального связывания с двумя нуклеотидами одной цепи. Это могут быть как соседние нуклеотиды, так и нуклеотиды, разделенные последовательностями различной длины [91, 92].

3. Межцепочечные сшивки, которые формируются путем бифункционального связывания с двумя нуклеотидами, принадлежащими различным цепям двойной спирали. Это могут быть комплементарные нуклеотиды одной пары оснований или нуклеотиды разных пар – соседних или разделенных последовательностями различной длины и состава [93, 96, 97].

Все типы химических модификаций структуры ДНК влияют на характер ее плавления [95–97], поскольку они изменяют свободную энергию спиральных и расплавленных пар оснований в точках своего расположения и смежных с ними областях. Следовательно, информация о влиянии сшивок на стабильность ДНК важна как для выявления механизмов биологической активности сшивающих агентов, так и для понимания свойств двойной спирали.

В качестве необратимо связывающихся лигандов рассмотрены два

Pt(II)-содержащих комплекса – цисдиаминдихлорплатина(II) (цис-ДДП) и транс-ДДП и два Ru(III)-содержащих комплекса – NAM1 и RAP. Структурные формулы этих соединений приведены ниже (см. схему 3).

а) **Платиновые комплексы цис-ДДП и транс-ДДП.** Интерес к платиновым комплексам достаточно высок, поскольку большинство из них обладает сильной противоопухолевой активностью [90, 91, 98]. Среди этих препаратов особый интерес представляют цис-ДДП и ее стереоизомер – транс-ДДП. Интерес к первой из них объясняется тем, что ДНК является клеточной мишенью для этого сильного противоопухолевого препарата [90–95, 99]. Она ковалентно связывается с клеточной ДНК и ингибирует ее репликацию. Стереоизомер же транс-ДДП также ковалентно связывается с ДНК, однако он клинически неактивен и менее цитотоксичен, чем цис-ДДП [100–102]. Решающую роль в реализации клеточных процессов играет целенаправленное воздействие платиновых комплексов на определенные нуклеотиды.

Основной тип взаимодействия цис-ДДП с ДНК – это бифункциональное взаимодействие с положениями N7 двух соседних гуаниновых оснований в одной и той же цепи в последовательностях типа d(GpG) в большой бороздке двойной спирали [103–105]. Этот тип взаимодействия составляет почти 65% от общей платинации при $r_b < 0,01$ (здесь $r_b = C_{\text{ДДП}}/C_{\text{пар нукл.}}$). Существенно меньше бифункциональных взаимодействий происходит в последовательностях типа d(ApG) (почти 23% от общей платинации [106]). Причем подобного типа взаимодействия происходят только при достижении насыщения взаимодействий в последовательностях типа d(GpGp) (при $0,02 < r_b < 0,1$). Следующий тип взаимодействий – это бифункциональные взаимодействия цис-ДДП с двумя гуанинами одной и той же цепи, разделенными любым другим нуклеотидом (последовательности типа d(GpXpG)). Этот тип взаимодействия составляет ~7% от общей платинации [92, 105]. Цис-ДДП может образовывать также хелаты, соединяя N7 с O6 одного гуанинового основания [107]. Монофункциональное связывание цис-ДДП и связывание межцепочечного типа относительно малы (соответственно 5% и 1% от общей платинации) [90, 95].

Транс-ДДП также предпочтительнее связывается с положениями N7 гуанина. Однако имеются данные о связывании достаточно высоких концентраций транс-ДДП с адениновыми основаниями. Исходя из своих стереохимических особенностей, транс-ДДП может образовывать 1–3-внутрицепочечный тип связывания в участках d(GpXpG) [101].

Следует отметить, что при низких концентрациях как цис-ДДП, так и транс-ДДП происходит монофункциональное комплексообразование с ДНК, которое превращается в один из бифункциональных типов связывания с увеличением концентрации платинового комплекса. Естественно, что все указанные виды связывания цис-ДДП и транс-ДДП приводят к изменениям температуры и интервала перехода спираль–клубок, деформации двойной спирали, а также одонитевым и двунитевым разрывам при достаточно высоких концентрациях ($r_b > 0,1$) [89, 104, 108]. В присутствии цис-ДДП и транс-ДДП происходит и существенное изменение конформации ДНК [109].

Попытаемся проанализировать эти результаты и полученные нами УФ-

и КД-данные с учетом того факта, что до сих пор нет единого стройного подхода к объяснению особенностей комплексообразования этих веществ с ДНК.

Таблица 3

Значения T_m и ΔT разных ДНК при различных относительных концентрациях r_b цис-ДДП и транс-ДДП (в скобках). Все измерения проводились в растворе 0,01M NaClO₄+0,001M NaCl

r_b	<i>Cl. Perfringens</i>		Тимус телянка	
	T_m , °C	ΔT , °C	T_m , °C	ΔT , °C
0	58,5 (58,5)	5,5 (5,5)	68,0 (68,0)	10,0 (10,0)
0,003	60,0 (59,5)	6,8 (6,8)	68,5 (69,2)	10,3 (12,1)
0,03	58,5 (61,5)	7,2 (12,5)	66,7 (70,0)	12,0 (14,3)
0,3	58,5 (63,5)	7,3 (12,5)	66,0 (72,3)	12,6 (18,2)
3	45,0 (42,5)	7,5 (7,5)	51,6 (53,5)	13,8 (11,0)
	<i>E. Coli</i>		<i>M. Luteus</i>	
	T_m , °C	ΔT , °C	T_m , °C	ΔT , °C
0	74,5 (74,5)	5,8 (5,8)	85,5 (85,5)	4,2 (4,2)
0,003	72,5 (76,5)	8,7 (8,1)	81,0 (89,0)	10,7 (7,0)
0,03	71,0 (77,8)	12,5 (14,0)	83,0 (91,8)	10,6 (9,2)
0,3	68,5 (80,0)	13,0 (15,8)	80,0 (-)	12,7 (-)
3	49,5 (51,5)	13,5 (11,0)	52,0 (-)	15,7 (-)

Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что в случае цис-ДДП имеет место дестабилизация АТ- и ГЦ-нуклеотидных пар. Причем дестабилизация ГЦ-пар несколько выше. В случае ДНК с высоким АТ-содержанием (*Cl. Perfringens* и тимус телянка) имеет место незначительное увеличение температуры плавления (на 2–3°С). Изменение ΔT также существенным образом зависит от ГЦ-содержания ДНК. Этот результат легко понять, если учесть, что для ГЦ-богатых ДНК бифункциональные взаимодействия в последовательностях типа d(GpG) более эффективны и насыщенные этим основным типом взаимодействия в ГЦ-богатых реализуется при более низких концентрациях цис-ДДП, чем в АТ-богатых ДНК.

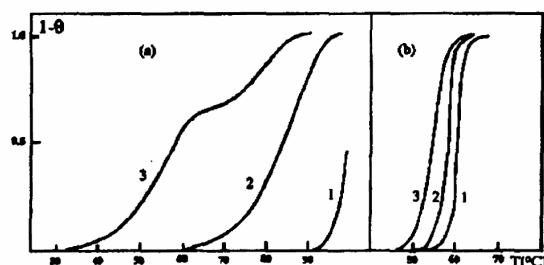


Рис. 18. Кривые плавления pdGpdC (а) и pdApdT (б):
1 – $r_b=0,003$; 2 – $r_b=0,03$; 3 – $r_b=0,3$.

Интересные результаты получаются в комплексах цис-ДДП–pdGpdC (рис. 18). Как и следовало ожидать, дестабилизация pdGpdC в присутствии цис-ДДП наиболее эффективна и, следовательно, процесс деградации ДНК наступает при достаточно низких концентрациях цис-ДДП (рис. 18). Начиная с $r_b=0,3$, кривая плавления pdGpdC принимает двуступенчатый вид, что указывает на присутствие сильного антикооперативного характера взаимодействия между лигандами, адсорбированными на ДНК [110]. Для pdApdT двуступенчатость плавления не наблюдается.

В случае же транс-ДДП независимо от ГЦ-содержания ДНК при концентрациях $0,3 > r_b > 0,003$ происходит рост термостабильности всех ДНК. К такому выводу приводит анализ данных табл. 3. Согласно [34], при концентрациях $0,003 < r_b < 0,03$ транс-ДДП монофункционально связывается с положением N7 гуанина, в результате ДНК переходит в более упорядоченную спиральную форму с более высокой термостабильностью. В случае же цис-ДДП при этих концентрациях преобладает 1–2 бифункциональное связывание с положениями N7 соседних гуанинов одной и той же цепи в последовательностях типа d(GpG) в большой бороздке двойной спирали [103, 104]. Скорее всего именно этим и определяется различное действие цис-ДДП и транс-ДДП на параметры плавления ДНК. При этом как в случае цис-ДДП, так и транс-ДДП в ДНК происходят существенные конформационные изменения.

Известно, что связывание цис-ДДП с ДНК приводит к конформационному изменению сахарного кольца от C₂'-эндо к C₃'-эндо [103]. Это свидетельствует о локальных В-А-конформационных изменениях в местах связывания. Однако только монофункциональным связыванием транс-ДДП с ДНК при столь низких концентрациях платинового комплекса ($0,003 < r_b < 0,03$) и 1–2 внутрицепочечным связыванием цис-ДДП при тех же концентрациях лиганда невозможно объяснить достаточно сильное изменение T_m и ΔT ДНК при $r_b = 0,003$ (см. табл. 3).

С учетом того, что при столь низких концентрациях лигандов невозможны высокие степени заполнения ДНК, ожидаемое увеличение δT_m можно оценить с помощью соотношения Д. Ю. Ландо [30, 110]:

$$\delta T_m = \frac{RT_0}{\Delta H \cdot l_1} \ln(1 - r_b),$$

где T_0 – температура плавления ДНК для $r_b = 0$, ΔH – энтальпия перехода спираль–клубок, R – газовая постоянная, l_1 – количество пар оснований, соответствующих одному центру связывания. Это соотношение справедливо при высоких степенях заполнения и высоких константах связывания лигандов с ДНК.

Расчеты показывают, что количество пар оснований l_1 между центрами связывания приблизительно равно 300. Это значит, что ковалентное связывание платиновых комплексов с редкими центрами связывания может приводить к существенным изменениям температуры плавления. В реальных системах количество этих центров может быть много меньше 300, поскольку возможны также и другие механизмы связывания цис-ДДП и транс-ДДП с ДНК [111, 112].

Другой вероятной причиной, приводящей к столь «экзотичным» изменениям поведения ДНК при комплексообразовании с платиновыми комплексами могут быть локальные В–А-переходы в макромолекуле в окрестности центра связывания [106]. Этот вопрос достаточно подробно исследован нами теоретически и экспериментально, а переходы В–А и спираль–клубок рассматривались на языке модели Зимма–Брегга [113]. Расчеты показали, что при столь низких концентрациях цис-ДДП ($r_b = 0,003$) локальный В–А-пере-

ход, индуцируемый платинацией ДНК, может привести к изменению T_m ДНК максимум на $0,1^{\circ}\text{C}$ [13, 110]. Столь незначительное изменение T_m не может объяснить экспериментально наблюдаемое сильное изменение в стабильности ДНК (реально наблюдается $\delta T_m = 4^{\circ}\text{C}$).

И наконец, следующей вероятной причиной, способной привести к подобным серьезным изменениям характеристик плавления ДНК, может быть значительное изменение вторичной и третичной структур ДНК, которые, как и в случае ионов двухвалентных металлов [19, 54], приводят к изменению потенциала дальнего действия между адсорбированными лигандами и его зависимости от степени спиральности [114]. Подобного рода эффекты возникают при существенном изменении суммарного заряда ДНК при ее комплексообразовании с лигандами [19, 54, 55, 110], что невозможно при столь низких концентрациях платинового комплекса. Действительно, в данном случае высокие степени насыщения ДНК лигандами достигаются уже при очень малых концентрациях последних ($r_b = 0,003$). При этом, как мы показали, существуют крайне редкие центры связывания, расстояния между которыми достаточно велики (~ 300 нуклеотидных пар). Эти центры очень чувствительны к нуклеотидным последовательностям в ГЦ-богатых участках гетерогенной ДНК [34, 109]. Нам представляется, что наиболее вероятной причиной столь «экзотического» изменения структуры ДНК при платинации могут быть агрегационные эффекты в макромолекуле [115]. В [34] нами было показано, что при комплексообразовании ДНК с цис-ДДП и транс-ДДП, кроме специфического связывания лигандов с ДНК, имеются также неспецифические факторы, влияющие на переход спираль-клубок (напр., локальные В-А-переходы, формирование внутримолекулярных или межмолекулярных агрегатов, процессы деградации ДНК и др.). Среди указанных неспецифических факторов при низких концентрациях лиганда ($\sim 0,003$) могут быть как локальные В-А-переходы, так и образования межмолекулярных и внутримолекулярных агрегатов в процессе плавления ДНК. Процессы же деградации ДНК происходят при существенно более высоких концентрациях ($1 < r_b < 0,1$) платиновых комплексов [108].

Мы полагаем, что при низких концентрациях платиновых комплексов не исключается возможность образования внутримолекулярных сшивок ДНК посредством бидентальных взаимодействий платиновых комплексов с N7 позициями гуанинов, расстояние между которыми вдоль цепи может составить несколько сот нуклеотидов. Такого рода взаимодействия платиновых комплексов с ДНК должны приводить к образованию кольцевых структур внутри макромолекулы и ее компактизации. Поскольку указанный эффект должен быть связан с молекулярной массой ДНК, то для низкомолекулярной ДНК изменения характеристик перехода спираль-клубок должны быть менее выражены. Результаты по плавлению фрагментированной ДНК (молекулярная масса которой на два порядка меньше) в присутствии цис-ДДП и транс-ДДП подтверждают это [110].

Таким образом, суммируя вышеизложенное, можно заключить, что для лигандов типа цис-ДДП и транс-ДДП существуют крайне редкие центры

связывания на ДНК в виде определенных нуклеотидных последовательностей, которые находятся в ГЦ-богатых участках гетерогенной ДНК. Эти лиганды уже при достаточно низких концентрациях способны серьезно влиять на структуру ДНК, что является крайне неожиданным результатом. Причины столь серьезных изменений структуры ДНК могут быть разными, и пока они однозначно не определены. Мы полагаем, что наиболее вероятными из них могут быть образование внутримолекулярных сшивок в ДНК и ее компактизация [110].

б) Рутениевые соединения. Другим классом необратимо связывающихся с ДНК лигандов являются соединения рутения. Некоторые комплексы Ru(III) проявляют ярко выраженную противоопухолевую активность,

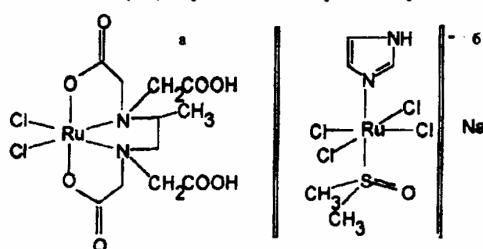


Схема 3. Ru(III)-содержащие комплексы RAP (а) и NAMI (б).

причем по сравнению с платиновыми комплексами обладают значительно меньшей токсичностью [116–118]. Этим и определяется фармакологический интерес к данным соединениям. В отличие от платиновых, комплексы рутения практически не изучены. Мы исследовали взаимодействие с ДНК двух комплексов Ru(III) NAMI (Na-транс-(диметилсуль-

фоксид)(имидазол)тетрахлорид рутения(III) и RAP (дихлоро-1,2-пропилендиаминтетраацетат рутения(III)) (схема 3).*

Как видно из табл. 4, комплексы рутения вызывают увеличение как термостабильности двойной спирали ДНК (изменение температуры плавления $\delta T_m \approx 1-4^\circ\text{C}$), так и интервала плавления ΔT . Причем стабилизация возрастает с увеличением концентрации комплексов рутения. Как показывают дифференциальные кривые плавления ДНК, в присутствии этих комплексов наблюдается избирательность их связывания по отношению к ГЦ-богатым участкам ДНК [59].

Таблица 4

Значения температуры (T_m) и интервала (ΔT) плавления ДНК тимуса теленка при различных концентрациях комплексов рутения

	ДНК	NAMI + ДНК		RAP + ДНК	
	$r_b=0$	$r_b=0,01$	$r_b=0,1$	$r_b=0,01$	$r_b=0,1$
$T_m, ^\circ\text{C}$	67,3	69,5	71,1	67,5	68,3
$\Delta T, ^\circ\text{C}$	9,8	9,9	14,1	10,2	11,5

Согласно данным, полученным по изучению этих комплексов методами кругового дихроизма и гель-электрофореза (см., напр., [119, 120]), изменения конформации и термостабильности при комплексообразовании с ДНК

* NAMI и RAP были синтезированы на химическом факультете Флорентийского университета и любезно предоставлены нам заведующим лабораторией неорганической химии проф. П. Ориоли.

значительно малы по сравнению с таковыми для цис-ДДП. В частности проведенные нами измерения спектров КД ДНК показали, что ни один из исследованных комплексов рутения практически не меняет спектры кругового дихроизма ДНК даже при высоких концентрациях ($r_b=0,1$) [121].

Известно, что большое влияние на процесс плавления оказывает межцепочечное сшивание нитей молекулы ДНК (это обусловлено топологическими ограничениями полного расхождения нитей ДНК) в результате ее плавления. Даже при низких степенях заполнения ДНК лигандами подобные взаимодействия могут привести к существенному увеличению температуры плавления. Исследование кривых ренатурации ДНК тимуса теленка при добавлении комплексов NAMI, RAP и цис-ДДП при $r=0,1$ показало, что ренатурация комплексов ДНК–лиганд составляет 27% для NAMI, 31% для RAP, 43% для цис-ДДП [121]. Отметим, что ренатурация чистой ДНК равна 7%. Относительно высокий процент ренатурации ДНК в присутствии комплексов рутения связан скорее всего с образованием межнитевых сшивок между гуаниновыми основаниями, расположенными в противоположных нитях биспирали ДНК.

Сравнение сшивающего действия металлоорганических соединений Pt(II) и Ru(III) показало, что по эффективности сшивания нитей ДНК их можно расположить в ряд: RAP < NAMI < цис-ДДП.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов ISTC A301.2, NFSAT MB 078-02 / CRDF 12027, NATO LST.CLG 979777.

Кафедра молекулярной физики

Поступила 29.06.2004

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В.И. – Мол. биол., 1983, т. 17, вып. 3, с. 616–621.
2. Arnott S., Dover S.D., Wonacoff A.I. – Acta Crystallogr., 1969, v. 25, № 11, p. 2192–2206.
3. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Minyat E.E., Frank-Kamenetski M.D. – J. Mol. Biol., 1974, v. 87, p. 817–833.
4. Arnott S., Chandrasecharan R., Birdsall D.L., Leslie A.G.W., Rattiff R.F. – Nature, 1975, v. 283, № 5449, p. 743–745.
5. Sindlenton C.K., Klysik I., Stirdivant S.M., Wells R.O. – Nature, 1982, v. 229, № 5881, p. 312–316.
6. Gray D.M., Rattiff R.L. – Biopolymers, 1975, v. 14, № 3, p. 487–497.
7. Ruth H., Scott M.C. – Biopolymers, 1981, v. 20, № 12, p. 2532–2552.
8. Wang A.H.J., Quigley G.I., Kolpak F.J., Cranford J.L., Boom I.H., Van-der Marel G., Reich A. – Nature, 1979, v. 282, № 5740, p. 680–686.
9. Франк-Каменицкий М.Д. – Мол. биол., 1983, т. 17, вып. 3, с. 639–652.
10. Vologodskii A.V., Anshelevich V.V., Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetski M.D. – Nature, 1979, v. 280, № 5720, p. 294–298.
11. Rice S.A., Doty P. – J. Am. Chem. Soc., 1957, v. 79, № 15, p. 3937–3947.
12. Веленов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменицкий М.Д. – Успехи физ. наук, 1971, т. 105, вып. 3, с. 479–519.
13. Haroutiunian I.S., Sarkisyan Sh.A., Antonyan A.P., Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Vardevanyan P.O. – J. Biomol. Struct. Dyn., 2003, v. 20, № 6, p. 886.
14. Асланян В.М., Арутюнян С.Г. – Биофизика, 1985, т. 30, вып. 5, с. 746–749.
15. Асланян В.М., Бабаян Ю.С., Арутюнян С.Г. – Биофизика, 1984, т. 29, с. 372–376.

16. Воскобойник А.Д., Монаселидзе Д.Р., Мгеладзе Г.М., Чанчалашвили З.Н., Лазуркин Ю.С., Франк-Каменецкий М.Д. – Мол. биол., 1975, т. 9, вып. 5, с. 783–789.
17. Арутюнян С.Г., Далян Е.Б., Хачикян Р.Э., Асланян В.М. – Биофизика, 1990, т. 35, вып. 4, с. 588–591.
18. Асланян В.М., Далян Е.Б., Шпаковский А.Г. – Биофизика, 1988, т. 33, вып. 4, с. 430–436.
19. Haroutiunian S.G., Dalian E.B., Aslanian V.M., Lando D.Yu., Akhrem A.A. – Nucl. Acids Res., 1990, v. 18, № 21, p. 6413–6417.
20. Семенов М.А., Кашпур В.А., Бельбух Т.В., Малеев В.Я. – Биополимеры и клетка, 1987, т. 3, №1, с. 18–21.
21. Слонницкий В.В., Фрисман Э.В. – Мол. биол., 1980, т. 14, вып. 3, с. 496–506.
22. Frisman E.V., Veselkov A.N., Slonitsky S.V., Karateev L.S., Vorobev V.I. – Biopolymers, 1979, v. 13, p. 2169–2178.
23. Привалов П.Л. – Мол. биол., 1969, т. 3, № 5, с. 690–695.
24. Привалов П.Л., Монаселидзе Д.Р., Мревлишвили Г.М., Магаладзе В.А. – ЖЭТФ, 1964, т. 47, вып. 6 (12), с. 2073–206.
25. Асланян В.М., Арутюнян С.Г. – Биофизика, 1985, т. 30, вып. 5, с. 741–746.
26. Асланян В.М., Арутюнян С.Г. – Биофизика, 1984, т. 29, вып. 1, с. 148–149.
27. Daune M., Dekker C.A., Schachman H.K. – Biopolymers, 1966, v. 4, № 1, p. 51–76.
28. Белнищев Б.Н., Вологодский А.В., Франк-Каменецкий М.Д. – Мол. биол., 1976, т. 10, № 4, с. 764–769.
29. Нечипуренко Ю. Д., Крылов А.С., Заседателев А.С., Гурский Г.В. – Мол. биол., 1984, т. 18, № 2, с. 332–342.
30. Ахрем А.А., Ландо Д.Ю. – Мол. биол., 1981, т. 15, вып. 5, с. 1083–1091.
31. Бирштейн Т.М., Птицын О.Б. Конформация макромолекул. М.: Наука, 1964, с. 270.
32. Ландо Д.Ю., Крот В.И., Франк-Каменецкий М.Д. – Мол. биол., 1975, т. 9, вып. 5, с. 856–860.
33. Франк-Каменецкий М.Д. – Мол. биол., 1968, т. 2, № 3, с. 408–419.
34. Haroutiunian S.G., Bruni B., Monnanni R., Mangani S., Orioly P. – Inorganica Chimica Acta, 1991, v. 184, p. 127–132.
35. Иванов В.И., Минченкова Л.Е., Тимофеев В.М. – Мол. биол., 1967, т. 1, вып. 5, с. 682–688.
36. Zimmer Ch., Luck G., Fritsch H., Treibel H. – Biopolymers, 1971, v. 10, p. 441–463.
37. Blagoi Yu.P., Sorokin V.A., Valeev V.A., Gladchenko G.O. – Biopolymers, v. 22, № 7, p. 1641–1656.
38. Eichorn G.L., Shin Y.A. – J. Am. Chem. Soc., 1968, v. 90, № 26, p. 7323–7328.
39. Luck K.F.S., Maki A.H., Hoover R.J. – J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 5, p. 1241–1242.
40. Förster W., Bauer E., Schütz b., Berg H., Acimenko M.M. – Biopolymers, 1979, v. 18, p. 625–661.
41. Zimmer Ch., Luck G., Triebel H. – Biopolymers, v. 15, № 3, p. 425–453.
42. Целикова С.В., Лобачев В.М., Мандругин А.А., Иванов В.И. – Мол. биол., 1976, т.10, вып. 5, с.1153–1158.
43. Mahler H.R., Mehrotra B.D. – Biochem. Biophys. Acta, 1963, v. 68, p. 211–233.
44. Mehrotra B.O., Mahler H.R. – Biochem. Biophys. Acta, 1964, v. 91, p. 78–91.
45. Aslanian V.M., Babaian Yu.S., Haroutiunian S.G., Tatevosian V.O. – Studia Biophysica, 1982, v. 87, № 2/3, p. 209–210.
46. Арутюнян С.Г. Влияние лигандов на структуру и стабильность ДНК как одномерного кристалла: Автореф. дисс. на соискание уч. ст. докт. физ.-мат. наук. Ер., 1993.
47. Привалов П.Л. – Биофизика, 1970, т. 15, вып. 2, с. 206–214.
48. Privalov P.L., Ptitsyn O.V., Birstein T.M. – Biopolymers, 1969, v. 8, p. 559–571.
49. Ptitsyn O.V., Birstein T.M. – Biopolymers, 1969, v. 7, p. 435–449.
50. Malenkov G.G., Minchenkova L.E., Minyat E.E., Schyolkina A.K., Ivanov V.I. – FEBS Letters, 1975, v. 51, № 1, p. 38–42.
51. Бабаян Ю.С. Влияние мочевины на конформационное состояние молекулы ДНК: Автореф. дисс. на соискание уч. ст. канд. физ.-мат. наук. Харьков, 1980, с. 116.

52. Ахрем А.А., Арутюнян С.Г., Ландо Д.Ю., Асланян В.М. – Докл. АН БССР, 1984, т. 28, № 3, с. 272–2757.
53. Зигель Ц. Ионы металлов в биологических системах. М.: Мир, 1982, с. 55.
54. Daune M. – *Studia Biophys.*, 1970, B-24-25, p.287–297.
55. Yurgaitis A.P., Lazurkin Yu.S. – *Biopolymers*, 1981, v. 20, p. 967–975.
56. Shin J. et al. – *Biopolymers*, 1973, v. 12, № 11, p. 2459–2475.
57. Ott G.S., Bastia D., Bauer W.R. – *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, v. 58, p. 216–232.
58. Clement R.M., Sturm J., Daune M.P. – *Biopolymers*, 1973, v. 12, p. 405–421.
59. Далян Е.Б. Структурообразование в комплексах ДНК-лиганд. Обратимое и необратимое связывание: Автореф. дисс. на соискание уч. ст. докт. физ.-мат. наук. Ер., 2002.
60. Eichhorn G.L., Shin Y.A., Butzov I.I. – *Transitions induced by metal complexes among several forms of DNA*. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1983, p.125–127.
61. Luck G., Zimmer Ch. – *Eur. J. Biochem.*, 1972, v. 29, p. 528–536.
62. Rifkind J., Shin Y. A., Heim J. M., Eichhorn G. L. – *Biopolymers*, 1976, v. 15, №10, p. 1879–1902.
63. Арутюнян С.Г., Асланян В.М., Ландо Д.Ю., Далян Е.Б., Шпаковский А.А. – *Биофизика*, 1988, т. 33, № 3, с. 430–436.
64. Корнилова С.В., Сорокин В.А., Гладченко Г.А., Благой Ю.П., Арутюнян С.Г. – *Мол. биол.*, 1991, т. 25, с. 648–654.
65. Далян Е.Б. – *Известия НАН РА, сер. Физика*, 2002, вып. 3, т. 37, с.186–190.
66. Nordheim A., Lafer E.M., Peck L.J., Wang A.H.J., Stollar B., Rich A. – *Cell*, 1982, v. 31, № 1, p. 309–318.
67. Благой Ю.П., Сорокин В.А., Божко Г.Х., Валеев В.А., Хоменко С.А. – *Studia Biophys.*, 1977, v. 65, № 1, p. 55–67.
68. Asanaka M., Kurimura T., Toya H., Ogaki K., Kato Y. – *AIDS*, 1989, v. 3, p. 403–404.
69. Marzilli L.G. – *New J.Chem.*, 1990, v. 14, p. 409–420.
70. Baguley B.C. – *Biophys.Chem.*, 1990, v. 35, p. 203–212.
71. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Costantino G., Caputi A.P. – *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, v. 26, № 1/2, p. 25–33.
72. Richard G., Geier III, Sasaki, T. – *Tetrahedron*, 1999, v. 55, p.1859–1870.
73. McMillin D.R., McNett K.M. – *Chem. Rev.*, 1998, v. 98, p. 1201–1219.
74. Хачоян В.И., Ордян М.Б., Мадакян В.Н., Казарян Р.К., Степанян А.С. – *Ж. exper. и клинич. медицины*, 1985, т. 25, № 1, с. 28–31.
75. Fiel R.J., Howard J.C., Mark E.H., Datta-Gupta N. – *Nucl.Acids Res.*, 1979, v. 6, № 9, p. 3093–3118.
76. Carvlin M.J., Datta-Gupta N., Fiel R.J. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, v.108, № 1, p. 66–73.
77. Kuroda R., Takahashi E., Austin K.A. Fisher L.M. – *FEBS Letters*, 1990, v. 262, № 2, p. 293–298.
78. Pasternack R.F., Gibbs E.J. In: *Metal ions in biological systems* (ed. A. Sigel & H. Sigel), 1996, v. 33, p. 367–397.
79. Perree-Fauvet M., Gresh N. – *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1994, v. 11, № 6, p. 1203–1224.
80. Hui X., Gresh N., Pullman B. – *Nucl. Acids Res.*, 1990, v. 18, p.1109–1114.
81. Pasternack R.F., P.R.Hubber, P.Boyd, G.Engasser, L.Francesconi, E.Gibbs, P.Fasella, G.C.Venturo, L.de C.Hinds – *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, v. 94, p. 4511–4517.
82. Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Ananyan G.V., Vardanyan V.I., Lando D.Yu., Madakyan V.N., Kazaryan R.K., Messori L., Orioli P., Benight A.S. – *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2001, v. 18, № 5, p. 677–687.
83. Далян Е.Б. – *Биофизика*, 2002, № 47, p. 253–258.
84. Gandini Sh.C.M., Yushmanov V.E., Perussi J.R., Tabak M., Borissevitch I.E. – *J. Inorg. Biochem.*, 1999, v. 73, p. 35–40.
85. Barnes N.R., Schreiner A.F., Finnegan M.G., Jonson M.K. – *Biospectroscopy*, 1999, v. 4, issue 5, p. 341–352.
86. Sehlstedt U., Kim S.K., Carter P., Goodisman J., Vollano J., Norden B., Dabrowiak J.C. – *Biochemistry*, 1994, v. 33, p. 417–426.
87. Kuroda R. and Tanaka H. – *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, p.1575–1576.

88. Brabec V., Leng M. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, v. 90, № 11, p. 5345–5349.
89. Lippard S.J. – Science, v. 218, № 4577, p. 1075–1082.
90. Brabec V., Reedijk J., Leng M. – Biochemistry, 1992, v. 31, № 49, p. 12397–12402.
91. Takahara P.M., Rosenzweig A.C., Frederick C.A. and Lippard S.J. – Nature, 1995, № 377(6550), p. 649–652.
92. van Boom S.S.G.E., Yang D., Reedijk J., van der Marel G.A., Wang A.H.J. – J. Biomol. Struct. Dyn., 1996, v. 13, № 6, p. 989–998.
93. Malinge J.M. and Leng M. In: Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. 1999, p. 159–180.
94. Breslauer K.J. – Methods in Enzymology, 1995, v. 258, p. 221–242.
95. Poklar N., Pilch D.S., Lippard S.J., Redding E.A., Dunham S.U., Breslauer K.J. – Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1996, v. 93, № 15, p. 7606–7611.
96. Urata H., Ueno M., Yamasaki F., Akagi M. – Biochem. Biophys. Res. Com., 1991, v. 175, № 2, p. 537–542.
97. Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Mamasachlissov Eu.Sh., Lando D.Yu. – In: Modern problems of cellular and molecular biophysics (eds. S. Ayrapetyan and A. North). Erevan: Noyan Tapan, 2001, p. 291–307.
98. Komess K.M., Lippard S.J. In: Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions, 1993, № 1, p.134–168.
99. Paquet F., Perez C., Leng M., Lancelot G., Malinge J.M. – J. Biomol. Struct. Dyn., 1996, v. 14, № 1, p. 67–77.
100. Schwartz A., Leng M. – J. Mol. Biol., 1994, 236(4), p. 969–974.
101. Boudvillain M., Dalbies R., Aussourd C., Leng M. – Nucl. Acids Res., 1995, v. 23, № 13, p. 2381–2388.
102. Brabec V., Sip M., Leng M. – Biochemistry, 1993, v. 32, № 43, p. 11676–11681.
103. Macquet J.P., Teophanides T. – Bioinorg. Chem., 1975, v. 5, p. 59–66.
104. Macquet J.P., Butour J.L. – Biochimie, 1978, v. 60, p. 601–614.
105. Kasparkova J., Mellish K.J., Qu Y., Brabec V., Farrell N. – Biochemistry, 1996, v. 35, № 51, p. 16705–16713.
106. Sherman S.E., Lippard S.J. – Chemical Reviews, 1987, v. 87, № 5, p. 1153–1181.
107. Boogard N., Redijk I. – J. Inorg. Biochem., 1991, v. 43, p. 428.
108. Eastman A. – Biochemistry, 1985, v. 24, p. 5027–5032.
109. Miller D.P., Ho K.M., Aroney H.Y. – Biochemistry, 1988, v. 27, p. 8599–8606.
110. Haroutiunian S.G., Dalian E.B., Morozov V.F., Mamasachlissov Eu.Sh., Shahinian M.S., Akhrem A.A., Lando D.Y., Messori L., Orioli P. – Inorganica Chimica Acta. 1998, pp. 275–276, 510–514.
111. Lando D.Yu., Fridman A.S., Haroutiunian S.G., Benight A.S., Collery Ph. – J. Biomol. Struct. Dyn., 2000, v. 17, № 4, p. 2000–2015.
112. Haroutiunian S.G., Vorob'ev V.L., Lando D.Yu. – J. Biomol. Struct. Dyn., 2000, v. 17, № 4, p. 2000–2015.
113. Zimm B.R., Bragg J.K. – J. Chem. Phys., 1949, v. 317, № 2, p. 526–533.
114. Fridman A.S., Brabec V., Haroutiunian S.G., Watell R.M., Lando D.Yu. – J. Biomol. Struct. Dyn., 2003, v. 20, № 4, p.1020–1036.
115. Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Mamasachlissov Y.Sh., Morozov V.F., Khachikyan R.E., Vardevanyan P.O., Orioli P., Bruni B. – Biophysics, 1997, v. 42, № 2, p.353–357.
116. Kratz F., Keppler B.K., Hartmann M. et al. – Metal Based Drugs. 1996, v. 3, p. 15–23.
117. Keppler BK, Lipponer K G, Stenzel B, Kratz F. In: Metal Complexes in Cancer Chemotherapy (BK Keppler ed.); Weinheim: Verlag Chemie VCH, 1993, p. 187–220.
118. Alessio E., Mestroni G., Sava G., Bergamo A., Coluccia M., Messori L. – In: Hadjiliadis D. (Ed.) – Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment, NATO ASI Series, Kluwer, 1997.
119. Barca A., Pani B., Tamaro M., Russo E. – Mutat. Res., 1999, v. 423, p. 171–181.
120. Alessio E., Balducci G., Lutman A., Mestroni G., Calligaris M., Attia W.M. – Inorganica Chimica Acta. 1993, v. 203, p. 205–217.
121. Messori L., Casini A., Vullo D., Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Orioli P. – Inorganica Chimica Acta. 2000, v. 303, p. 283–286.

Ս. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Վ. Ի. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ

ԴՆԹ-Ի ՍԱԿՐՈՍՏՈՒԵԿՈՒԼԻ ԿՈՄՊԼԵՔՍԱՌ-ԱԶՍՑՄԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՑԱԾՐԱՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ
ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՀԵՏ

Ամփոփում

Ակնարկը նվիրված է ԴՆԹ-ի հետ դարձելի և ոչ դարձելի կապվող լիգանդների կոմպլեքսառաջացման առանձնահատկությունների ուսումնասիրությանը: Որպես դարձելի կապվող ընտրված են կապման տարբեր մեխանիզմներով բնութագրվող երեք տիպի ցածրամոլեկուլային լիգանդներ: Այդպիսիք են, մասնավորապես, առաջին անցումային շարքի երկվալենտ մետաղների իոնները, պորֆիրինային կոմպլեքսները, ինչպես նաև ցվիտերիոնային տիպի ամինաթթուները: Որպես ոչ դարձելի կապվող լիգանդներ ընտրված են Pt(II) և Ru(III)-ի միացությունները: Դրանց ընտրությունը պայմանավորված է այն բանով, որ նրանք ընդգրկում են կենսաբանական համակարգերում գոյություն ունեցող հնարավոր բոլոր տիպերի փոխազդեցությունները:

Աշխատանքում համակարգվում են ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի հետ վերը նշված լիգանդների փոխազդեցությունների ընդհանուր օրինաչափությունները և բացահայտվում դրանց յուրահատուկ առանձնահատկությունները:

S. G. HAROUTIUNIAN, V. I. VARDANYAN, Y. B. DALYAN

THE PECULIARITIES OF COMPLEXATION OF DNA
MACROMOLECULE WITH LOW MOLECULAR LIGANDS

Summary

The present review is devoted to the analysis of peculiarities of DNA complexation with reversibly and irreversibly binding ligands. Three classes of low molecular ligands with different types of binding were discussed. These types of ligands particularly are: bivalent transitional metal ions, porphyrin complexes, and zwitterionic amino acids. As irreversible binding ligands some Pt(II) and Ru(III) complexes were used.

The systematization of the general patterns and revealing of specific differences in interaction of above mentioned ligands with double helix DNA is presented.