

## АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ДНК ПРИ ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КООРДИНАЦИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ, СОДЕРЖАЩИМИ АМИНОКИСЛОТЫ

Касьяненко Н.А.<sup>1</sup>, Борисова И.В.<sup>1</sup>, Екимов А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская набережная, 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ

Поступила в редакцию: 08.08.2019

**Аннотация.** В работе рассматривается взаимодействие высокомолекулярной ДНК с соединениями платины, содержащими дипептид D, L-аланил-L-лейцин. Проводится сравнение влияния на конформацию ДНК мооядерного и биядерного соединений. Мооядерное соединение (AL-1) содержит дипептид в виде бидентатного лиганда, присоединенного к атому платины в цис-конфигурации. В биядерном соединении (AL-2) дипептид является связующим лигандом. В цис-положении к нему находятся замещающиеся атомы хлора. Соединения являются электролитами и хорошо растворяются в воде. Методами спектрофотометрии, кругового дихроизма, вискозиметрии и атомной силовой микроскопии показано, что в условиях эксперимента соединение AL-1 не взаимодействует с молекулой ДНК, тогда как AL-2 связывается с ДНК, при этом формируется координационная связь платины с N7 гуанина в большой бороздке. Об этом свидетельствует эксперимент с протонирование ДНК после формирования ее комплексов с AL-2. Связывание проявляется как при малой, так и при большой концентрации поддерживающего электролита (NaCl). Таким образом, не только электростатические взаимодействия играют важную роль в формировании комплексов соединения AL-2 с ДНК. Обсуждается изменение конформационных параметров ДНК при связывании (объем молекулярного клубка, изгибная жесткость или персистентная длина ДНК).

**Ключевые слова:** ДНК, координационные соединения платины, растворы.

Химиотерапия представляет собой один из основных способов лечения онкологических заболеваний. На некоторые злокачественные новообразования можно воздействовать только посредством химиотерапии, в остальных случаях медикаментозное лечение проводят с целью контроля над развитием заболевания, для его сдерживания и облегчения симптомов.

Препараты на основе платины (цисплатин, карбоплатин и оксоплатин) являются эффективными средствами борьбы с различными видами опухолей. Однако такие препараты обладают серьезными побочными эффектами, например, высокая токсичность и низкая избирательность. Затрудняет их использование и способность клеток приобретать устойчивость к препаратам. Цитотоксическое действие соединений платины было открыто Б. Розенбергом еще в начале 1960-х годов при наблюдении влияния электрического тока на рост бактерий [1], однако лишь небольшое количество новых соединений разрешено использовать в клинике. В настоящее время продолжается синтез и испытание новых соединений платины и координационных соединений других металлов платиновой группы с целью уменьшения серьезных побочных эффектов, затрудняющих использование препаратов платины в терапии опухолей. Механизм действия препаратов платины обусловлен их взаимодействием с молекулой ДНК в клетке. Для предварительной оценки потенциальной эффективности новых соединений проводят исследование их взаимодействия с ДНК *in vitro* в модельных водно-солевых растворах. Сравнение тестируемых соединений с известным противоопухолевым препаратом цис-ДДП и его неактивным изомером транс-ДДП, который не проявляет противоопухолевой активности, позволяет выявить характерные особенности новых комплексных соединений.

Общепринятой является точка зрения, согласно которой первый и самый эффективный препарат платины – цис-дихлородиамминплатина (II) или цис-диаминдихлорплатина (II), цис-ДДП (препарат цисплатин) образует координационную связь с азотистыми основаниями ДНК. При этом наблюдается ярко выраженная избирательность к GC-парам [2-4]. Связывание комплексного иона платины с ДНК включает в себя стадию акватации — замещения хлора в координационной сфере платины на воду с образованием комплексных ионов  $[Pt(NH_3)_2(H_2O)Cl]^+$  или  $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ . Последующее замещение воды на входящий атом N7 гуанина или N7 аденина, которые находятся в большой бороздке ДНК, приводит к формированию инертного комплекса. Присоединение к аденину было обнаружено только на второй стадии связывания цис-ДДП с ДНК, то есть уже после того, как N7 атом гуанина вошел в координационную сферу платины [8].

Комплексы цис-ДДП с ДНК могут представлять собой бифункциональные аддукты с образованием как межнитевых, так и внутринитевых сшивков [5-8]. Возможно также образование монофункциональных аддуктов.

Одним из направлений модификации соединений платины является введение пептидов в координационную сферу комплексобразующего иона. Действительно, в естественных условиях взаимодействие между белками и нуклеиновыми кислотами осуществляются на всех этапах репликации ДНК, а также в ходе многочисленных процессов клеточной саморегуляции. В связи с этим правильный выбор пептидов может обеспечить хорошее

средство препаратов с ДНК. Известно несколько возможных типов взаимодействий между пептидами и нуклеиновыми кислотами [9]: электростатическая связь между фосфатными группами и положительно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков (лизина, гуанидиновой группы аргинина и протонированным остатком гистидина); водородная связь между фосфатными группами, нуклеотидами, углеводными частями нуклеиновых кислот и протон-донорными и протон-акцепторными группами пептида; стэкинг-взаимодействие между боковыми группами остатков ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина, гистидина) и нуклеотидами по механизму, аналогичному интеркаляции; гидрофобные взаимодействия 5-метил цитозина и тимина с неполярными боковыми группами пептидов. Комплексы платины (II), имеющие в составе аминокислоты или пептиды, привлекают внимание из-за своей способности снижать токсичность препаратов [9-11]. Введение пептидных лигандов может изменить цитотоксические свойства известных препаратов [11].

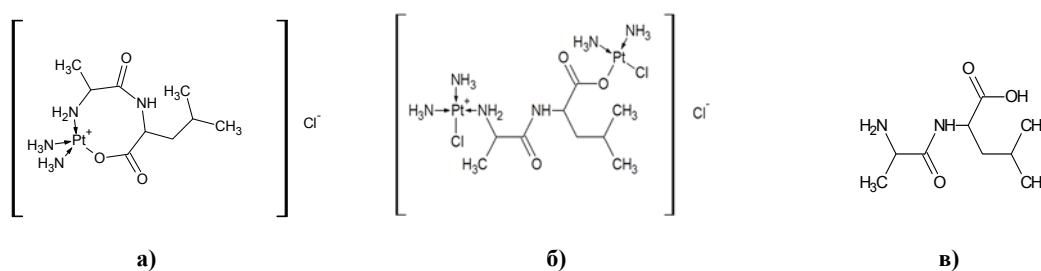
В работе для изучения взаимодействия соединений платины с ДНК использовали методы вискозиметрии, кругового дихроизма, спектрофотометрии и атомной силовой микроскопии. По изменению вязкости растворов ДНК можно зафиксировать изменение объема молекулярного полимерного клубка. В работе определяли величину относительной вязкости раствора  $\eta_r = \eta/\eta_0$ , где  $\eta$  — вязкость раствора,  $\eta_0$  — вязкость растворителя. Величину  $\eta_r - 1 = \eta_{sp}/c$  называют удельной или специфической ( $\eta_{sp}$ ) вязкостью. Она зависит от концентрации раствора, поэтому более корректно использовать приведенную вязкость  $\eta_{пр} = \frac{\eta_r - 1}{c}$ . К молекулам высокомолекулярной ДНК в растворе можно применить модель свободно-сочлененной цепи, состоящей из одинаковых статистических сегментов длиной  $A$  (длина сегмента Куна, которая является мерой термодинамической жесткости полимера). Для полимерных клубков, у которых за линейный размер принимается среднеквадратичное расстояние между концами цепи  $\langle h^2 \rangle^{1/2}$ , справедлива формула Флори,

$$[\eta] = \frac{\Phi \langle h^2 \rangle^{3/2}}{M},$$

где  $\Phi$  – константа Флори;  $M$  – молекулярная масса. Величина характеристической вязкости  $[\eta]$  определяется из концентрационной зависимости приведенной вязкости растворов экстраполяцией к  $C = 0$ .

Метод вискозиметрического титрования основан на измерении вязкости растворов ДНК одинаковой концентрации с постепенно увеличивающейся концентрацией соединения, вступающего с ДНК во взаимодействие. Метод удобен тем, что позволяет быстро оценить наличие изменений в макромолекулярных параметрах ДНК при взаимодействии. По данным эксперимента строится зависимость относительного изменения приведенной или специфической вязкости раствора от концентрации вводимого вещества. Постоянство значений специфической вязкости в таком эксперименте может свидетельствовать как об отсутствии взаимодействия, так и о реализации внешнего (бороздочного) связывания, при котором не происходит изменения макромолекулярных параметров. Для исключения одной из двух возможных ситуаций необходимы дополнительные исследования, например, спектральными методами. Увеличение приведенной вязкости ДНК может происходить как в результате возрастания контурной длины и/или длины сегмента, так и в результате изменения межмолекулярного взаимодействия и появления межмолекулярных ассоциатов. Можно утверждать, что при интеркационном связывании специфическая вязкость при постоянной концентрации макромолекулы должна увеличиваться, но обратное утверждение в общем случае неверно, и для доказательства существования интеркаляции требуются дополнительные исследования, например, параллельное измерение характеристической вязкости и оптической анизотропии макромолекулы. При уменьшении размеров клубка за счет экранирования зарядов фосфатов может наблюдаться падение приведенной вязкости раствора. В работе использовали модифицированный ротационный вискозиметр типа Зимма-Крозерса [12]. АСМ изображения были получены с использованием атомного силового микроскопа NTEGRA (ресурсный центр Нанотехнологий СПбГУ). Измерения спектров кругового дихроизма проводили в кварцевых кюветах длиной  $l = 1$  см с помощью автодихрографа Mark IV (Франция). Измеряли разность молярных коэффициентов экстинкции циркуляно-поляризованных волн  $\epsilon_L - \epsilon_R = \Delta\epsilon$  (для левой и правой поляризации соответственно) в зависимости от длины волны падающего света. Величина  $\Delta\epsilon$  измеряется в области поглощения хромофоров. В полипептидных цепях и белках специфическими хромофорами являются пептидная связь, аминокислоты с боковыми гетероциклическими радикалами (тирозин, фенилаланин, триптофан) и цистеин. Для ДНК хромофорами являются азотистые основания.

В работе рассматривается взаимодействие молекулы ДНК с моно- и биядерными платиновыми комплексами, содержащими дипептиды (рис. 1).



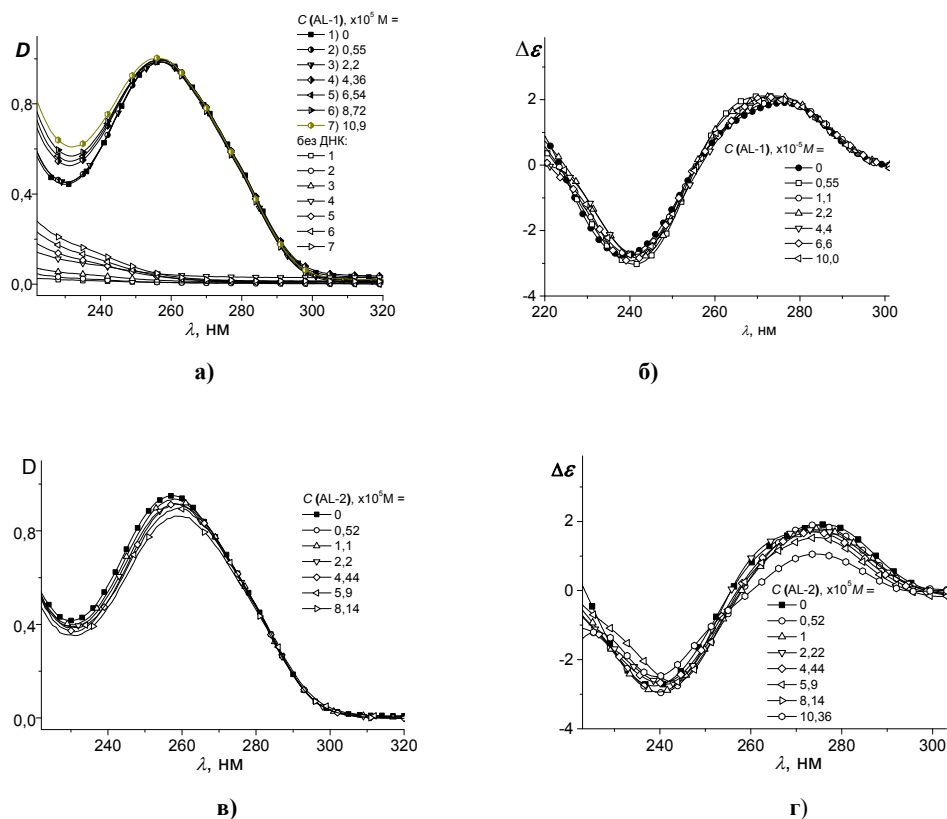
**Рисунок 1.** Структура используемых в работе соединений: AL-1 (**а**), AL-2 (**б**) и лиганд (**в**), входящий в состав соединений (AL)

Как видно из рисунка 1, соединение  $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{AL]Cl}$ , обозначенное AL-1, представляет собой мооядерный комплекс платины с бидентатным лигандом, обозначенным как AL (это D,L-аланил-L-лейцин). Соединение  $\text{cis-[Pt}_2(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{AL]Cl}$ , обозначенное как AL-2, – это биядерный комплекс платины. Лиганд AL является общим для двух атомов платины, а в *цис*-положении к нему у каждого атома платины находится уходящий атом хлора. Все соединения синтезированы в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете.

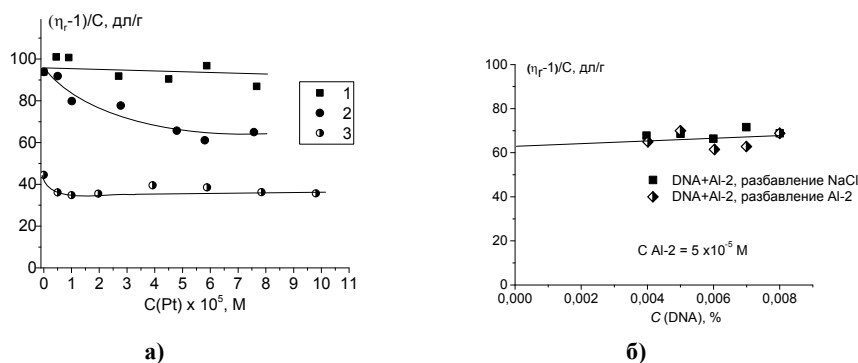
На рисунке 2 приведены спектры УФ поглощения и кругового дихроизма ДНК в комплексах с соединениями AL-1 и AL-2. Видно, что при использовании двуядерного комплекса платины наблюдается заметное изменение спектров поглощения и кругового дихроизма ДНК, тогда как мооядерный комплекс влияет на них очень мало.

Измерение приведенной вязкости растворов ДНК с ростом концентрации соединений AL-1 и AL-2 (рис. 3 а) также показало различие во влиянии этих соединений на конформацию ДНК. Если соединение AL-1 практически не вызывает изменения вязкости, то в случае AL-2 реализуемое взаимодействие отражается в существенном падении вязкости растворов ДНК.

Взаимодействие AL-2 с ДНК наблюдается даже в растворах с большой концентрацией поддерживающего электролита (1 М NaCl), когда полиэлектролитное набухание ДНК полностью подавлено. Отсюда следует, что AL-1, по-видимому, не взаимодействует с ДНК в условиях эксперимента, тогда как AL-2 связывается с макромолекулой. При этом не только электростатические силы обеспечивают связывание. Это связывание вызывает изменение спектральных свойств ДНК и падение объема молекулярного клубка в результате уменьшения жесткости макромолекулы (в 1 М NaCl падение вязкости может быть вызвано только этой причиной).



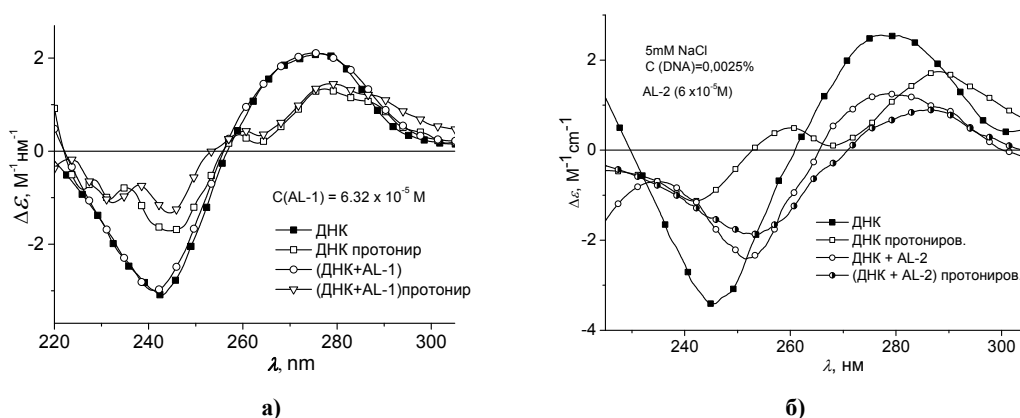
**Рисунок 2.** Спектры поглощения (**а, в**) и кругового дихроизма (**б, г**) ДНК в растворе 0,005 М NaCl при добавлении соединения AL-1 (**а, б**) и AL-2 (**в, г**). Для соединения AL-2 на рисунке **в** приведены вычисленные спектры поглощения ДНК (вычтен вклад соединения в суммарный спектр). Концентрации соединений указаны на рисунке



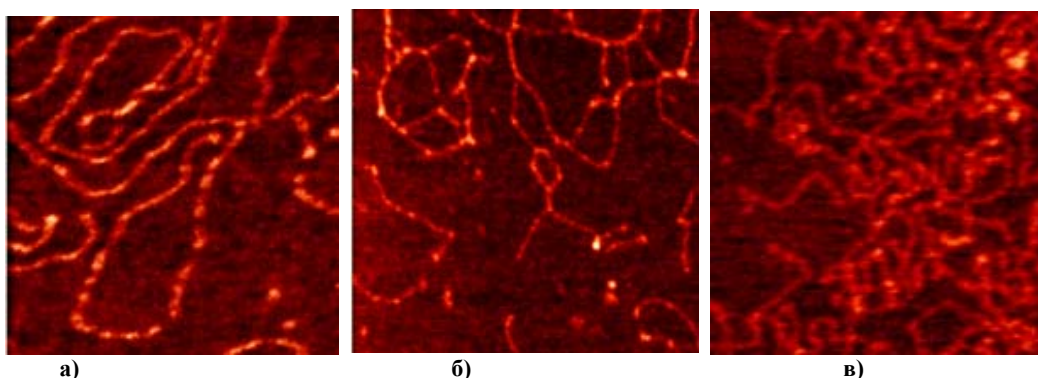
**Рисунок 3.** а) Зависимость приведенной вязкости растворов ДНК от концентрации соединений Al-1 (1) и Al-2 (2, 3) в 0,005 M NaCl (1, 2) и в 1 M NaCl (3); б) зависимость приведенной вязкости растворов от концентрации ДНК при двух способах разбавления исходного раствора (пояснения в тексте)

Мы провели эксперимент с разным разбавлением готового раствора, содержащего комплексы ДНК с соединением AL-2, при определении характеристической вязкости ДНК (рис. 3 б). Предварительно этот раствор выдерживали сутки при температуре 4°C, чтобы сформировались координационные связи платины с ДНК. Если реализуется равновесное связывание, когда для определения характеристической вязкости ДНК надо специально поддерживать постоянным соотношение между связанными и свободными лигандами в растворе ДНК, используемые способы разбавления приводят к разным зависимостям. Если же реализуется координационная связь, она не успевает разрушиться (а новые связи не успевают образоваться) при намеренном изменении соотношения между свободными и связанными с ДНК молекулами Al-2. Это и наблюдалось в нашем эксперименте. При разбавлении исходного раствора растворителем 0,005 M NaCl, сохранялось постоянным отношение  $C(Pt)/C(ДНК)$ . А при использовании раствора Al-2 в 0,005 M NaCl той же концентрации, что и в исходном растворе, мы сохраняли постоянной  $C(Pt)$ . Одинаковый ход зависимости указывает, что реализовалось сильное связывание AL-2 с ДНК. Можно говорить о формировании координационной связи.

Как показал эксперимент, свободный лиганд AL с ДНК не взаимодействует. Это следует и из спектральных данных, и из вискозиметрии (данные не показаны). Характер изменения спектральных свойств ДНК указывает на связывание соединения с ДНК в большой бороздке. По-видимому, в комплексообразовании участвует группа N7 гуанина. Действительно, при связывании положительно заряженных соединений с ДНК по этой позиции, в том числе и координационных соединений платины, наблюдается гипохромный эффект и батохромный сдвиг полосы поглощения ДНК [13, 14]. Такую тенденцию мы видим на рисунке 2. Отсюда можно полагать, что соединение AL-2 также формирует координационную связь с N7 гуанина. Для проверки этого предположения мы рассмотрели процесс протонирования двуспиральной ДНК после формирования ее комплексов с AL-1 и AL-2 (рис. 4). Известно, что протонирование двуспиральной ДНК на первом этапе происходит по положению N7 гуанина в большой бороздке. Это сопровождается характерным изменением спектра КД ДНК (см. рис. 4). После формирования комплексов ДНК с AL-2 протонирования ДНК не наблюдается (позиция N7 гуанина занята связыванием с AL-2). Напротив, присутствие в растворе ДНК соединения AL-1 не препятствует протонированию макромолекулы, то есть в этом случае позиция N7 гуанина остается свободной. Отсюда следует, что соединение AL-1 не связывается с ДНК, с соединением AL-2 формирует комплекс, при этом платина координирована к N7 гуанина. Следует заметить, что из структуры соединения AL-2 следует возможность замещения одного или двух



**Рисунок 4.** Спектры кругового дихроизма ДНК и ее комплексов с Al-1 (а) и AL-2 (б) в 0,005 M NaCl при нейтральных рН и при  $pH = 4,25 \pm 0,05$



**Рисунок 5.** АСМ изображения ДНК (а), ДНК в комплексе с Al-1 (б) и с AL-2 (в). Размер изображений 500 нм × 500 нм

атомов хлора на воду с последующим вхождением гетероциклического атома азота оснований ДНК. У соединения AL-1 такой возможности нет, так как координационная сфера платины занята инертными лигандами.

Метод атомной силовой микроскопии (АСМ) позволяет визуализировать комплексы ДНК с соединениями платины. На рисунке 5 приведены АСМ изображения ДНК при связывании с AL-1 и AL-2. Хорошо видно, что комплексообразование с AL-2 приводит к компактизации макромолекул.

Суммируя полученные в работе данные, можно заключить, что биядерное соединение платины взаимодействует с ДНК, формируя координационную связь платина-ДНК в большой бороздке с атомом N7 гуанина. Мы полагаем, что связывание приводит к уменьшению термодинамической жесткости ДНК, в результате чего макромолекула приобретает меньший объем и более «запутанную» форму. Моноядерное соединение платины в условиях эксперимента с молекулой ДНК не взаимодействует. По-видимому, это обусловлено структурой координационной сферы платины, содержащей только инертные лиганды, не склонные к замещению.

#### Список литературы / References:

1. Rosenberg B., Vancamp L., Trosko J. E., Mansour V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 1969, vol. 222, pp. 385-386.
2. Pinto A.L., Lippard S.J. Binding of the antitumor drug cis- diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 780, pp. 167-180.
3. Zamble D.B., Mu D., Reardon J.T., Sancar A., Lippard S.J. Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 10004-10013.
4. Reedijk J., Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem. Commun.*, 1996, vol. 7, pp. 801-806.
5. Fichtinger-Schepman A.M., van der Veer J.L., den Hartog J.H., Lohman P.H.M., Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis- diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 1985, vol. 24, pp. 707-713.
6. Brabec V., Kleinwächter V., Butour J.L., Johnson N.P. Biophysical studies of the modification of DNA by antitumour platinum coordination complexes. *Biophys. Chem.*, 1990, vol. 35, pp. 129-141.
7. Касьяненко Н.А., Богданов А.А., Дефрене С. Взаимодействие молекулы ДНК с координационными соединениями платины и кобальта в растворе. *Биофизика*, 2002, т. 47, с. 449-452. [Kasyanenko N.A., Bogdanov A.A., De fresne S. Interaction of DNA molecule with coordination compounds of platinum and cobalt in solution. *Biofizika*, 2002, vol. 47, pp. 449-452. (In Russ.)]
8. Barnham K.J., Bernens-Price S.J., Frenkiel T.A., Frey U., Sadler P.J., Platination Pathways for Reactions of Cisplatin with GG Single-Stranded and Double-Stranded Decanucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, vol. 34, pp. 1874-1877.
9. Luscombe N.M., Laskowski R.A., Thornton J.M. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, pp. 2860-2874.
10. Chardon E., Dahm G., Guichard G., Bellemin-Lapponnaz S. Derivatization of Preformed Platinum N-Heterocyclic Carbene Complexes with Amino Acid and Peptide Ligands and Cytotoxic Activities toward Human Cancer Cells. *Organometallics*, 2012, vol. 31, pp. 7618-7621.
11. Moradell S., Lorenzo J., Rovira A., van Zutphen S., Avilés F. X., Moreno V., de Llorens R., Martinez M.A., Reedijk J., Llobeta A. Water-soluble platinum(II) complexes of diamine chelating ligands bearing amino-acid type substituents: the effect of the linked amino acid and the diamine chelate ring size on antitumor activity, and interactions with 5'-GMP and DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, vol. 98, pp. 1933-1946.
12. Frisman E.V., Schagina L.V., Vorobiev V.I. A glass rotation viscometer. *Biorheology*, 1965, vol. 2, pp. 189-194.

13. Kas'ianenko N.A., Valueva S.V., Smorygo N.A., D'iachenko S.A., Frisman E.V. Study of the interaction of a DNA molecule with coordination compounds of divalent platinum I. Effect of cis-diaminodichloroplatinum on molecular parameters of DNA in solution. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 1995, vol. 29, pp. 345-353.

14. Kas'ianenko N.A., Karymov M.A., D'iachenko S.A., Smorygo N.A., Frisman E.V. Interaction of DNA molecules with divalent platinum coordination complexes. II. Effect of the nature and location of ligands in the first platinum coordination sphere. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 1995, vol. 29, pp. 585-596.

#### ANALYSIS OF CHANGE IN DNA CONFORMATION IN COMPLEXES WITH COORDINATION PLATINUM COMPOUNDS CONTAINING AMINO ACIDS

Kasyanenko N.A.<sup>1</sup>, Borisova I.V.<sup>1</sup>, Ekimov A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg State University

*Universitetskaya Embankment, 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru*

<sup>2</sup>St. Petersburg State University of Pharmaceutical Chemistry  
*st. Professor Popov, 14, lit. A, St. Petersburg, 197376, Russia*

**Abstract.** The interaction of high molecular DNA with platinum compounds containing the dipeptide D, L-alanyl-L-leucine was studied. The influence of mononuclear and binuclear platinum compounds on DNA conformation in a solution was compared. The mononuclear compound (AL-1) contains a dipeptide in the form of a bidentate ligand attached to the platinum atom in a cis configuration. In the binuclear compound (AL-2), the dipeptide is a common ligand for two platinum atoms. The chlorine atom is in the cis position to this ligand for each platinum atom in AL-2. Compounds are electrolytes and are highly soluble in water. It was shown by the methods of spectrophotometry, circular dichroism, viscometry, and atomic force microscopy, that under the experimental conditions the AL-1 compound does not interact with the DNA molecule, while AL-2 binds to DNA with the coordination of a platinum atom to N7 guanine in the major groove. This is evidenced by an experiment with DNA protonation, that after the formation of DNA complexes with AL-2, the N7 guanine is not available to other agents. Binding appears at both low and high concentrations of supporting electrolyte (NaCl). Thus, not only electrostatic interactions play an important role in the formation of complexes of AL-2 with DNA. The change in the conformational parameters of DNA upon binding (molecular coil volume, bending stiffness or persistent length of DNA) is discussed.

**Key words:** DNA, platinum coordination compounds, solutions.