

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК С СОЕДИНЕНИЕМ СО(II),
СОДЕРЖАЩИМ 1,10-ФЕНАНТРОЛИН**

Павленова К.Н., Демидов В.Н., Касьяненко Н.А.
Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская набережная 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ
e-mail: pavlenova.kristina@gmail.com

Аннотация. Рассмотрено взаимодействие молекулы ДНК с координационным соединением двухвалентного кобальта, содержащим фенантролиновые лиганды, в растворе 0,005 М NaCl. Спектральные исследования показали, что в условиях эксперимента происходит образование комплексов. При этом в связывании с ДНК принимают участие фенантролиновые лиганды, входящие в состав соединения. Гипохромный эффект в спектре поглощения, наблюдаемый при образовании таких комплексов, может указывать на формирование димеров фенантролина или даже стопочных структур при связывании. Такое связывание достигает насыщения при $r > 0,4$ (r – отношение молярных концентраций C соединения и ДНК, для которой C выражена в молях пар оснований). Одновременно с этим, по-видимому, осуществляется интеркаляция фенантролинового лиганда в двойную спираль ДНК, как это следует из данных вискозиметрии – происходит возрастание приведенной вязкости растворов ДНК примерно на 20%. Такое связывание достигает насыщения при $r > 0,2$, а при $r > 0,4$ начинается образование иных комплексов, что, напротив, вызывает падение вязкости растворов ДНК. Это падение не связано с уменьшением жесткости макромолекулы в результате нарушения вторичной структуры ДНК при связывании, так как, напротив, наблюдается ее стабилизация в комплексе, как это следует из изучения плавления ДНК в указанных условиях.

Мы можем полагать, что кобальт способен образовывать координационную связь с молекулой ДНК. При этом один из фенантролиновых лигандов, который в результате такого связывания получил большую подвижность (одна связь с кобальтом разрушилась в результате координации кобальта к основанию ДНК), и который имеет большое сродство к основаниям ДНК, будет стремиться интеркалировать в двойную спираль. Оставшийся фенантролиновый лиганд может вступать во взаимодействие с аналогичными фенантролиновыми лигандами другого связанного с ДНК кобальта или со свободным фенантролином, который также может присутствовать в растворе в результате трансформации соединения кобальта при связывании с ДНК. Все эти взаимодействия и могут оказать влияние на изменение измеряемых параметров.

Ключевые слова: ДНК, соединение кобальта с фенантролином, образование комплекса, интеркаляция.

DNA INTERACTION WITH Co(II) COMPOUND CONTAINING 1,10-PHENANTHROLINE

Pavlenova K.N., Demidov V.N., Kasyanenko N.A.
Saint-Petersburg State University
Universitetskaya Emb., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia
e-mail: pavlenova.kristina@gmail.com

Abstract. DNA interaction with a coordination Co(II) compound containing phenanthroline ligands in a 5mM NaCl solution is studied. Spectral studies have shown that complex forms under experimental conditions. The phenanthroline ligands of the compound take part in binding to DNA. The hypochromic effect in the absorption spectrum upon the formation of these complexes is observed. It may indicate the formation of phenanthroline dimers or even stack structures upon binding. Such binding reaches saturation at $r > 0.4$ (r is the ratio of the molar concentrations C of the compound and DNA (in moles of base pairs for DNA)). At the same time, it seems that the phenanthroline ligand is intercalated into the DNA double helix, as follows from the viscosimetry data – the viscosity of the DNA solutions increases by approximately 20%. This binding reaches saturation at $r > 0.2$, and at $r > 0.4$ the formation of another complexes begins, which causes a decrease of the DNA solutions viscosity. This decrease is not associated with a decrease of the DNA stiffness as a result of the breakdown of the secondary structure of DNA upon binding, because its stabilization in the complex is observed, as follows from the study of DNA melting.

We can assume that cobalt is able to form a coordination bond with the DNA molecule. In this case, one of the phenanthroline ligands, which received a great mobility upon binding (one bond with cobalt was destroyed as a result of coordination binding of cobalt to the DNA base), and which has a great affinity for the DNA bases, will tend to intercalate into a double helix. The remaining phenanthroline ligand can interact with similar phenanthroline ligands of another cobalt bound to DNA or with free phenanthroline, which can be in solution because of transformation of the cobalt compound upon binding to DNA. All these interactions can influence the change of the measured parameters.

Key words: DNA, Co(II) compound, phenanthroline, complexformation, intercalation.

Введение. Публикации, посвященные изучению взаимодействия молекулы ДНК с координационными соединениями металлов, занимают важное место в ведущих научных журналах. Это связано, в частности, с биологической активностью некоторых соединений этого класса, например, противоопухолевое действие ряда препаратов платины [1,2]. Биологическая активность координационных соединений металлов, содержащих фенантролин, хорошо известна [3-5]. Было показано, что комплексы металлов с 1,10-фенантролином взаимодействуют с молекулой ДНК как интеркаляторы [6,7]. Они также могут образовывать с ДНК координационные связи. Фенантролин в комплексах с Co(II)/Co(III) может участвовать в окислительном поражении ДНК [8, 9]. Отсюда ясно,

что исследование взаимодействия молекулы ДНК с соединением кобальта, содержащим фенантролин, в растворе представляет интерес для понимания молекулярных основ действия таких соединений *in vivo*.

Материалы и методы. Использовали коммерческий препарат высокомолекулярной тимусной ДНК (Sigma Aldrich) с молекулярной массой 12×10^6 , определенной по значению характеристической вязкости ДНК в 0,15 М NaCl. Образцы растворяли в дистиллированной воде, затем доводили концентрацию поддерживающего электролита до выбранного значения с помощью растворов NaCl. В данной работе исследования проводили с использованием растворов, содержащих определенные концентрации ДНК, соединения кобальта и 0,005 М NaCl. Комплексы готовили сливанием равных объемов растворов компонентов в 0,005 М NaCl. Измерения проводили через 10 минут после сливания и через сутки (растворы хранили в темноте при температуре 4°C).

Спектры поглощения регистрировали с использованием спектрофотометра СФ-56 (ЛОМО, Россия). Вязкость растворов ДНК и ее комплексов с соединением кобальта измеряли с использованием низкоградиентного ротационного вискозиметра типа Зимма-Крозера при градиентах скорости от 0,5 до 7 сек⁻¹. Так как для измеряемых растворов градиентной зависимости вязкости в используемом диапазоне градиентов не наблюдалось, значение относительной вязкости раствора η_r находили усреднением измерений отношения количества оборотов ротора в растворе и растворителе за единицу времени. Для построения зависимости использовали величину приведенной вязкости $(\eta_r - 1)/C$ раствора ДНК конечной концентрации C .

Плавление высокомолекулярной ДНК изучали на спектрофотометре Specord 2000.

Результаты и их обсуждение. Рассматривается взаимодействие молекулы ДНК с координационным соединением двухвалентного кобальта (см. рис. 1) в растворе. После нескольких дней хранения водно-солевых растворов соединения (5mM NaCl) наблюдается небольшое уменьшение поглощения, которое может быть связано с некоторым изменением взаимодействия хромофоров – фенантролиновых лигандов. На см. рис. 2а приведены данные для наибольшей и наименьшей из используемых при формировании комплексов с ДНК концентраций соединения кобальта.

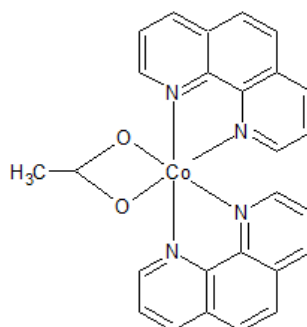


Рисунок 1 – Структура соединения $\text{Co}(1,10\text{-phen})_2(\text{OAc})_2$

Используемое в работе соединение кобальта имеет полосу поглощения в том же частотном диапазоне, что и молекула ДНК. При смешивании растворов ДНК и соединения кобальта спектр поглощения смеси отличается от суммы спектров компонентов взаимодействия до смешения для тех же концентраций (см. рис. 2б).

На см. рис. 3а приведен результат спектрофотометрического титрования при постоянной концентрации ДНК (0,0025%). Так как полосы поглощения ДНК и соединения кобальта пересекаются, сложно сделать вывод на основании полученных в эксперименте данных.

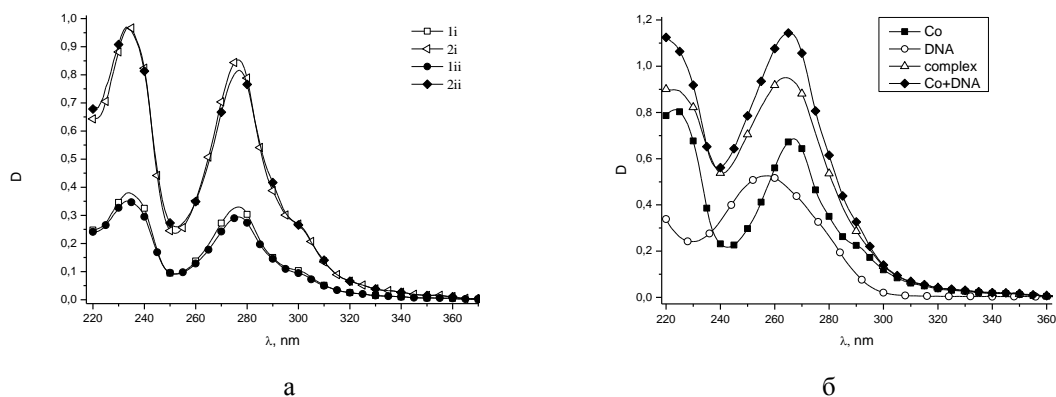
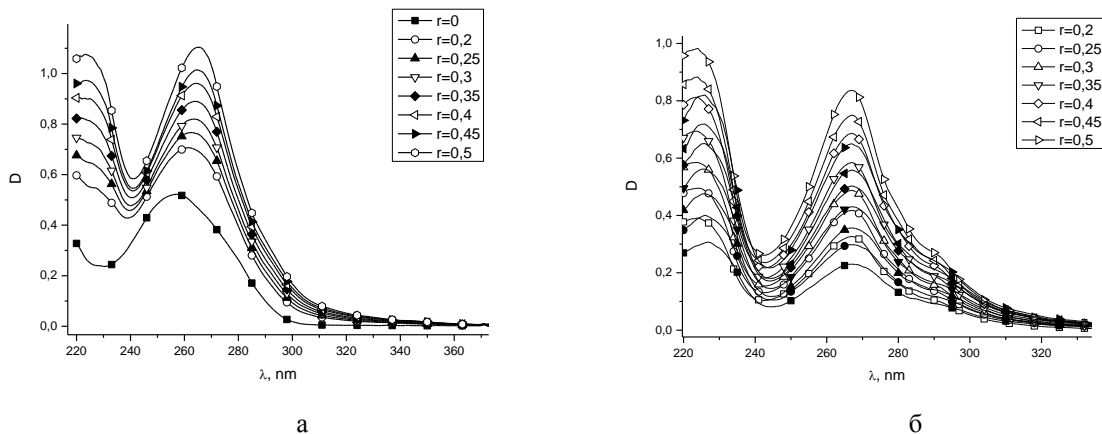


Рисунок 2 – Спектры поглощения соединения кобальта (а) и его комплекса с ДНК (б) в mM NaCl при $C(\text{ДНК})=0,0025\%$ и $\text{pH}=6,0 \pm 0,1$ при 21°C для всех растворов. (а) – $C(\text{Co})=0,76 \cdot 10^{-5}$ М (1) и $C(\text{Co})=1,89 \cdot 10^{-5}$ М (2), линии с пустыми значками (i) относятся к измерениям, выполненным через 10 минут после смешения растворов ДНК и соединения кобальта, линии с заполненными значками (ii) показывают результат измерений тех же растворов через 24 ч. (б) – дополнительно приведена сумма спектров ДНК и соединения той же концентрации, что и в комплексе



а

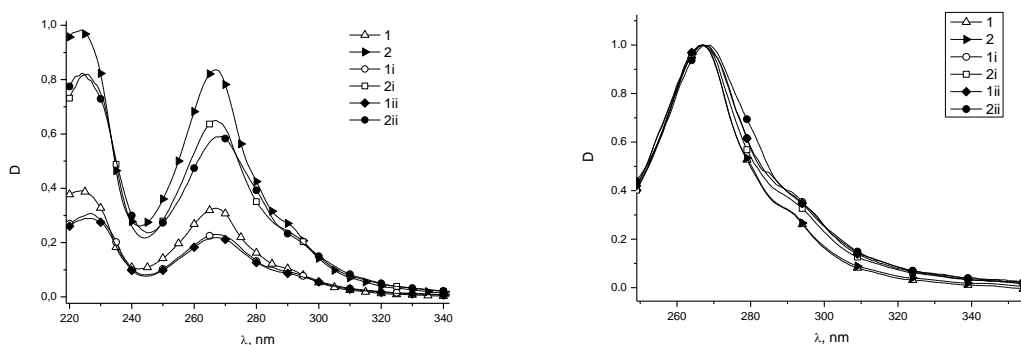
б

Рисунок 3 – Спектры поглощения растворов ДНК в mM NaCl с соединением кобальта при разных $C(\text{Co})$ через 10 минут после приготовления (а) и спектры после вычета поглощения ДНК (заполненные значки) в сравнении со спектрами свободного соединения (пустые значки) разных концентраций (б)

Полагая, что спектр поглощения ДНК в этих растворах не меняется, мы вычислили спектры поглощения соединения при разных концентрациях (см. рис. 3б). Для подробного рассмотрения на см. рис. 4 приведены эти спектры для наименьшей и наибольшей концентрации соединения (а) и нормированные на максимум соответствующей полосы (б). Этот рисунок демонстрирует, что связывание приводит к появлению «плеча» в области длин волн более 270 нм и гипохромному эффекту. При большой концентрации кобальта в растворе ДНК на второй день изменения более значительны (растворы хранятся при температуре 4° С). Эта концентрация соответствует отношению молярных концентраций соединения и ДНК (в молях пар оснований) $r = 0,5$ (5 молекул на 10 пар оснований).

Эти данные однозначно показали образование комплексов соединения кобальта с молекулой ДНК в растворе. Интересно отметить, что после вычета поглощения соединения спектр поглощения ДНК приобретает форму (см. рис. 5а), которая свидетельствует о том, что в процессе взаимодействия изменяются спектральные свойства соединения кобальта. Таким образом, можно предположить, что в связывании участвуют фенантролиновые лиганды, отвечающие за спектр поглощения соединения. Увеличение концентрации соединения кобальта в растворе ДНК при $C(\text{ДНК}) = \text{const}$ приводит к тому, что трансформация спектра поглощения ДНК прекращается при достижении $C(\text{Co}) = 1,51 \cdot 10^{-5} \text{M}$, соответствующей $r = 0,4$ (см. рис. 5б).

В следующем эксперименте использовали растворы соединения кобальта с разными концентрациями ДНК при постоянной концентрации соединения ($1,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$). После вычета поглощения ДНК видно, что помимо гипохромного эффекта, который может указывать на формирование димеров или иных ассоциатов, вызывающих изменение поглощения фенантролина в составе соединения при образовании комплексов с ДНК, наблюдаются и иные изменения в спектре – батохромный сдвиг спектра и изменение относительной интенсивности неразрешенных полос в спектре поглощения соединения в комплексе по сравнению со спектром свободного соединения (см. рис. 6).



а

б

Рисунок 4 – Спектры поглощения растворов соединения кобальта (а) и нормированные на максимум соответствующей полосы спектры соединения (б). (а), (б) – изображены спектры свободного соединения при $C(\text{Co}) = 0,76 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (1) и $C(\text{Co}) = 1,89 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (2) и вычисленные спектры соединения в комплексе, где значки (i) соответствуют результатом первого дня, а (ii) – второго дня (а)

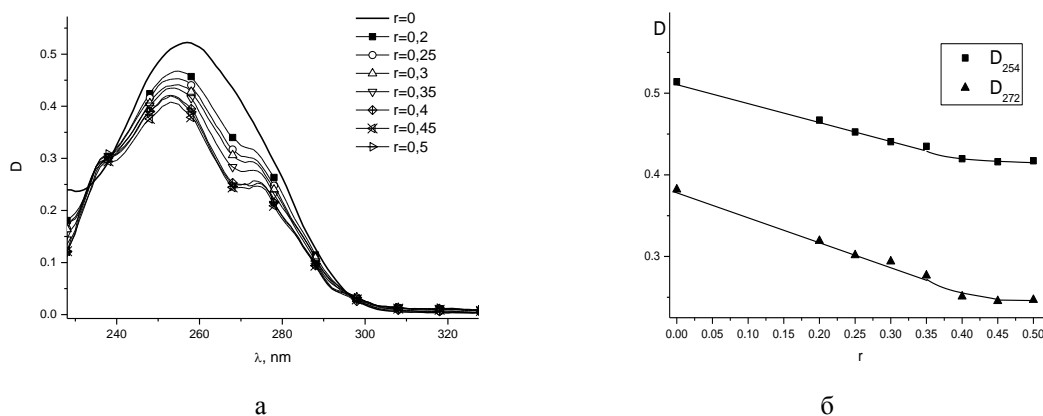


Рисунок 5 – Вычисленные спектры поглощения ДНК в комплексах с соединением кобальта (а) и зависимость D_{272} и D_{254} от концентрации соединения кобальта в растворе (б)

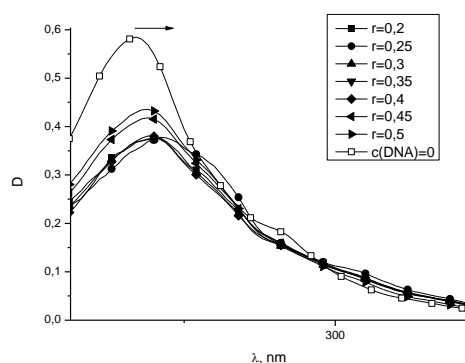


Рисунок 6 – Спектр поглощения свободного соединения кобальта (пустые значки) и вычисленные спектры соединения в комплексах с разной концентрацией ДНК

Изменение спектральных свойств ДНК и соединения при образовании комплексов указывает на участие соответствующих хромофоров в связывании. Изучение гидродинамических свойств растворов ДНК с соединением кобальта дает информацию о конформационных изменениях ДНК, так как не связанные с ДНК соединения кобальта не вносят вклада в измеряемую приведенную вязкость растворов.

На см. рис. 7 приведена зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК при $C(\text{ДНК})=0,004\%$. Из рисунка видно, что с увеличением концентрации соединения в растворе вязкость растворов возрастает. Это может быть следствием, например, интеркаляции фенантролиновых лигандов. Возрастание прекращается при достижении $r=0,25$ (5 соединений на 20 пар оснований). Дальнейшее уменьшение вязкости указывает на то, что в растворе существует и другой способ связывания.

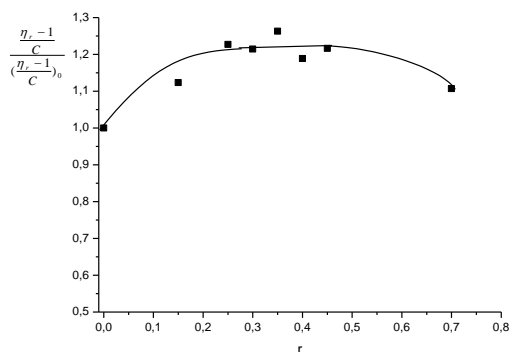


Рисунок 7 – Зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК с соединением кобальта от концентрации соединения

Изучение плавления высокомолекулярной ДНК после образования комплексов показало, что связывание существенно стабилизирует вторичную структуру ДНК. Так как фенантролиновые лиганды поглощают и вносят вклад в D_{260} , следует считать, что упорядоченность таких лигандов также разрушается при плавлении (об этом, в частности,

свидетельствует значительный гиперхромный эффект на 260 нм при плавлении комплекса ДНК с соединением кобальта).

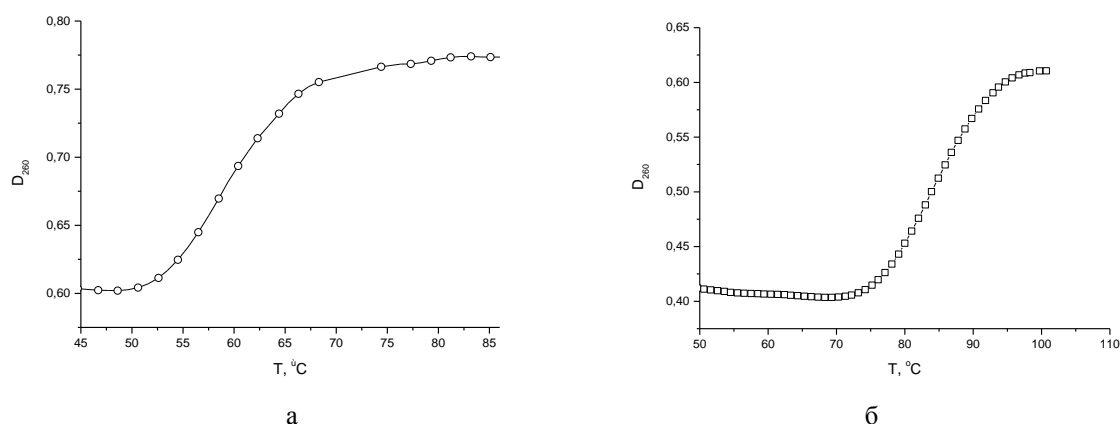


Рисунок 8 – Кривая плавления для ДНК в 0,005 М NaCl, C=0,0025% (а) и ДНК в комплексе при $r = 0,4$ (б)

Из спектральных данных следует, что в условиях эксперимента в растворе 0,005 М NaCl происходит взаимодействие молекулы ДНК с соединением кобальта. При этом в связывании принимают участие фенантролиновые лиганды. Гипохромный эффект в спектре поглощения может указывать на формирование димеров фенантролина или даже стопочных структур. Такие структуры наблюдаются при связывании с ДНК других координационных соединений металлов с фенантролином [10]. Такое связывание достигает насыщения при $r > 0,4$. Одновременно с этим, по-видимому, осуществляется интеркаляция фенантролинового лиганда в двойную спираль ДНК, как это следует из данных вискозиметрии – происходит возрастание приведенной вязкости растворов ДНК примерно на 20%. Такое связывание достигает насыщения при $r > 0,2$, а при $r > 0,4$ связывание, напротив, вызывает падение вязкости. Это падение не связано с уменьшением жесткости макромолекулы в результате нарушения ее вторичной структуры, так как, напротив, наблюдается ее стабилизация в комплексе, как это следует из изучения плавления ДНК в указанных условиях.

Мы можем полагать, что кобальт способен образовывать координационную связь с молекулой ДНК. При этом фенантролиновый лиганд, который в результате такого связывания получил большую подвижность (одна связь с кобальтом разрушилась в результате координации кобальта к основанию ДНК), и который имеет большое сродство к основаниям ДНК, будет стремиться интеркалировать в двойную спираль. Оставшийся фенантролиновый лиганд может вступать во взаимодействие с аналогичными фенантролиновыми лигандами другого связавшегося с ДНК кобальта или со свободным фенантролином, который также может присутствовать в растворе в результате трансформации соединения кобальта при связывании с ДНК. Все эти взаимодействия и могут оказать влияние на изменение измеряемых параметров.

Работа частично поддержана грантом СПбГУ в поддержку междисциплинарных исследований 11.37.290.2015.

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. Wheate N.J., Walker S., Craig G.E., Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.*, 2010, vol. 39, pp. 8113-8127.
3. Pitie M., Croisy A., Carrez D., Boldron C., Meunier B. Cytostatic activity of 1,10-phenanthroline derivatives generated by the clip-phen strategy. *ChemBiochem*, 2005, vol. 6, pp. 686-691.
4. Demidov V.N., Kas'yanenko N.A., Antonov V.S., Volkov I.L., Sokolov P.A., Pakhomova T.B., Simanova S.A. Reaction with DNA and pharmacologic activity of 1,10-phenanthroline and electron-rich 1,10-phenanthrocyanine complexes of d-elements. *Russian J. General Chem.*, 2012, vol. 82, pp. 602-620.
5. Coyle B., Kinsella P., McCann M., Devereux M., O'Connor R., Clynes M., Kavanagh K. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. *Toxicol. In Vitro*, 2004, vol. 18, pp. 63-70.
6. Erkkila K.E., Odom D.T., Barton J.K. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. *Chem. Rev.*, 1999, vol. 99, pp. 2777-2795.
7. Brodie C.R., Collins J.G., Aldrich-Wright J.R. DNA binding and biological activity of some platinum(II) intercalating compounds containing methyl-substituted 1,10-phenanthrolines. *Dalton Trans.*, 2004, vol. 8, pp. 1145-1152.
8. Lu W., Vivic D.A., Barton J.K. Reductive and oxidative DNA damage by photoactive platinum(II) intercalators. *Inorg. Chem.*, 2005, vol. 44, pp. 7970-7980.
9. Osinsky S., Levitin I., Sigan A., Bubnovskaya L., Ganusevich I., Campanella L., Wardman P. Redox-active cobalt complexes as promising antitumor agents. *Russian Chemical Bulletin*, 2003, vol. 52, pp. 2636-2645.
10. Kasyanenko N., Qiushi Z., Bakulev V., Osolodkov M., Sokolov P., Demidov V. DNA binding with acetate bis(1,10-phenanthroline)silver(I) monohydrate in a solution and metallization of formed structures. *Polymers*, 2017, vol. 9, iss. 6, pp. 211-230.