

Количественная оценка индуцированных межнитчатых сшивок ДНК в наномолярном интервале

А. В. Шугалий

Институт химической физики в Черноголовке
142432, Московская обл., п/о Черноголовка

При ренатурации препарата модифицированной ДНК животного происхождения полностью восстанавливается структура дуплекса после тепловой денатурации, если число межнитчатых сшивок (МС) составляет ≥ 1 на фрагмент ДНК. Уменьшение числа сшивок до величины менее одной МС на фрагмент приводит к пропорциональному снижению уровня ренатурации. Детектируемое количество сшитых нуклеотидных пар в комплексе ДНК с противоопухолевым соединением цисплатином составляет при спектрофотометрической регистрации единицы наномолей.

Цитотоксичность соединений различной природы обусловлена, прежде всего, индукцией геномных повреждений, нерепарируемых (или ограниченно репарируемых) в процессе жизнедеятельности клетки [1, 2]. К числу подобных повреждений относят сшивки ДНК как внутри-, так и межнитчатые; их появление ассоциирует, в частности, с противоопухолевой активностью многочисленных терапевтических соединений, в первую очередь, цис-изомера дихлордиамминплатины (цисплатина, цисPt) [3, 4].

Для оценки сшивок в ДНК необходимо каждый раз решать самостоятельную задачу их детектирования — или в составе суммарного препарата, или гидролизата (энзиматического, химического).

Мы предлагаем для суммарного препарата сравнительно простой метод оценки количества межнитчатых сшивок (МС) в интервале значений, не превышающих одну сшивку на фрагмент ДНК. Метод основан на сравнении характеристик ренатурации препаратов ДНК, содержащих различное число МС. Присутствие, как минимум, по одной МС во всех фрагментах ДНК известной молекулярной массы (м. м.) приводит при охлаждении к полной ренатурации всего препарата. В случае, когда в том же препарате вклад МС составляет величину менее 1 МС на фрагмент, доля молекул, восстановивших дуплексную структуру, снижается. Это регистрируется при спектрофотометрическом измерении как уменьшение общей степени ренатурации препарата.

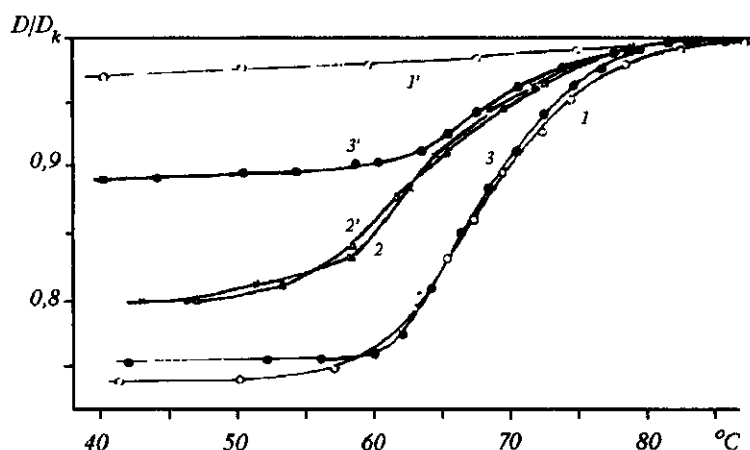
В опытах использовали коммерческий препарат ДНК селезенки быка со средней м. м. ≈ 7 МДа, что отвечает $\approx 10^4$ пар нуклеотидов (п. н.) или $2 \cdot 10^4$ н. ДНК с цисPt инкубировали в течение 24 ч в 0,01 М Na-бикарбонатном буфере (рН 7) при исходных соотношениях реагентов в интервале 1,125:1—25:1.

Связанный цисPt регистрировали методом атомной абсорбционной спектроскопии (количество связанного цисPt выражено как молярное отно-

шение $r = \text{Pt}/\text{нуклеотид}$). После достижения полной денатурации (95°C) проводили медленное охлаждение со скоростью $\approx 10^\circ\text{C}/\text{ч}$ и определяли уровень ренатурации с последующим повторным плавлением.

Как известно, основным типом повреждений ДНК, возникающих при взаимодействии с цисPt, являются внутринитчатые сшивки, их доля для комплексов *in vitro* составляет $\approx 90\%$ [3]. В то же время вклад МС, предположительно включающих G противоположных нитей ДНК, не превышает 1% [5], однако именно с их возникновением связывают, например, мутабельность цисPt в отношении *Ha-ras* человека [6].

На рисунке представлена кривая плавления препарата исходной ДНК (кривая 1). При охлаждении исходная ДНК не восстанавливает структуру дуплекса (кривая 1'), тем более что в наших ионных условиях ($0,01\text{ M Na}$) какая-либо реассоциация исключена [7]. Некоторое снижение оптической плотности ассоциировано с однонитчатым стэкингом, при нагревании он нарушается и оптическая плотность возрастает до значения денатурированной ДНК. Комплекс с $r = 0,05$ ведет себя совершенно иначе. При охлаждении отмечается полное восстановление структуры, повторное плавление происходит так же, как и плавление исходного препарата (кривые 2 и 2'). Цикл нагревание — охлаждение может быть повторен несколько раз с одинаковым результатом.



Кривые начального (1—3) и повторного (1'—3') плавления ДНК селезенки быка и комплексов цисPt/ДНК при различных молярных соотношениях $r = \text{Pt}/\text{нуклеотид}$ в $0,01\text{ M Na}$ -бикарбонатном буфере, pH 7. 1 и 1' — исходная ДНК; 2 и 2' — комплекс с $r = 0,05$; 3 и 3' — комплекс с $r = 0,015$. По оси ординат — отношение текущего значения оптической плотности D к значению D_k при 95°C

Характер ренатурации комплекса с $r = 0,015$ несколько иной, что следует из сравнения кривых 2' и 3'. Кривая доплавления имеет практически те же термодинамические характеристики, что и первоначальное плавление, $T_m = 68$ и $67,7^\circ\text{C}$, $\Delta T = 13,5$ и 14°C соответственно. Единственное отличие от комплекса с $r = 0,05$ — уровень ренатурации. Если для $r = 0,05$ он отвечал полному восстановлению дуплексной структуры у всех молекул препарата, то для $r = 0,015$ — лишь у $30\text{—}40\%$ молекул. Отметим специально, что речь идет именно о $30\text{—}40\%$ молекул препарата, а не $30\text{—}40\%$ структуры всех молекул — в противном случае мы бы имели значения T_m и ΔT при доплавлении, отличающиеся от исходных. Если восстановление структуры дуплекса однозначно ассоциировано с нерасхождением нитей в конце денатурации, то следует признать, что эффект

обусловлен присутствием МС, образованных благодаря реакции соответствующих нуклеофильных сайтов нуклеотидов с цисPt [4].

При реассоциации ДНК, когда осуществляется свободный поиск комплементарной нити, именно образование «ядра» дуплекса является лимитирующим этапом восстановления структуры, дальнейшее «зашнуровывание» происходит достаточно быстро [8]. В данном случае роль «ядра» выполняет короткий участок дуплекса в месте межнитчатой сшивки, подобная ситуация реализуется для всех молекул комплекса с $r = 0,05$.

С переходом к комплексу с $r = 0,015$ общее число образованных аддуктов на молекулу ДНК уменьшается с $\approx 10^3$ до $3 \cdot 10^2$ ($2 \cdot 10^4$ н. $\cdot 0,05 = 10^3$; $2 \cdot 10^4$ н. $\cdot 0,015 = 3 \cdot 10^2$). При этом возникает ситуация, когда структуру восстанавливают 30—40 % молекул. Это означает, что лишь 30—40 % молекул содержат по МС, их вклад, таким образом, составляет для данного препарата величину, равную 1 МС на $300 \cdot (0,3—0,4) = 1000—750$ аддуктов, или 0,1—0,15 % от всех образованных аддуктов. Если учесть, что в наших экспериментах концентрация ДНК в кювете спектрофотометра при регистрации кривых плавления составляла 15 мкг/мл или $2 \cdot 10^{-5}$ М н. п., а мы детектируем присутствие 1 МС на двунитчатый фрагмент из 10^4 п. н., то чувствительность подобной регистрации МС составляет величину $2 \cdot 10^{-9}$ М при отнесении на нуклеотидную пару.

Следовательно, для количественной оценки необходимо «попасть» в интервал значений МС, не превышающих 1 МС на фрагмент. Ход наших рассуждений о единичности МС у комплекса с $r = 0,05$ мы проверили следующим образом. Если на молекулу $\approx 10^4$ п. н. приходится единичная МС, то фрагментация уже образованного комплекса приведет к тому, что лишь у части новых, более коротких фрагментов, будет присутствовать МС. Пропорция этой части молекул должна определяться соотношением длин фрагментов исходной ДНК и полученной в результате фрагментации.

Комплекс с $r = 0,05$ и м. м. $\approx 10^4$ п. н. мы продробили путем продавливания через подобранную иглу шприца, при этом фрагмент уменьшился до $\approx 2,5 \cdot 10^3$ п. н. Этот препарат ренатурировал при охлаждении на ≈ 30 %, в отличие от уже приводимой нами полной ренатурации исходного комплекса с $r = 0,05$ и фрагментами $\approx 10^4$ п. н. Это означает, что у фрагментов $2,5 \cdot 10^3$ п. н. лишь 1/3 молекул содержит по одной МС. Результат достаточно хорошо согласуется с 4-кратным снижением молекулярной массы фрагментов в результате дробления.

Таким образом, предлагаемый метод позволяет оценить вклад «спитых» нуклеотидных пар ДНК, составляющий единицы наномолей. Для оценки необходимо сравнить степени ренатурации препаратов с различным уровнем сшивок в интервале < 1 МС на используемый фрагмент.

Автор признателен сотрудникам группы Н. Д. Соколова за проведение измерений методом атомной абсорбционной спектроскопии; М. В. Личиной — за техническую помощь в работе.

О. В. Шугалий

Кількісна оцінка індукованих міжниткових зшивок ДНК у наномолярному інтервалі

Резюме

При ренатурації препарату модифікованої ДНК тваринного походження відбувається повне відновлення структури дуплексу після теплової денатурації, якщо число міжниткових зшивок (МЗ) становить ≥ 1 на фрагмент ДНК. Зменшення числа зшивок до величини менше однієї МС на фрагмент призводить до пропорційного падіння рівня ренатурації. Детектована кількість зшитих нуклеотидних пар у комплексі ДНК з протипухлинною сполукою цисплатиною дорівнює при спектрофотометричній реєстрації одиницям наномоль.

A. V. Shugaliy

The quantitative estimation of induced DNA interstrand crosslinks in nanomoles interval

Summary

The method of estimation is based on the comparison of renaturation degree for DNA samples with a different quantity of the interstrand crosslinks (IC). At renaturation of modified animal DNA the complete recovery of duplex structure after the melting occurs if the quantity of IC is >1 per fragment. The decrease of this quantity to a value <1 per fragment causes the proportional reduction of renaturation degree. The quantity of crosslinked nucleotide pairs in DNA complex with an anticancer drug cisplatin may be detected in nanomoles by spectrophotometric method.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mechanisms of DNA damage and repair: implication for carcinogenesis and risk assessment.*—New York: Pergamon press, 1985.—Vol. 38.—578 p.
2. *Johnson N. P., Butour J. L., Villani G.* Progress in clinical biochemistry and medicine.—Heidelberg: Springer, 1989.—Vol. 10.—P. 59—68.
3. *Roberts J. J., Thomson A. J.* The mechanisms of action of antitumor platinum compounds // *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*—1979.—22, N 1.—P. 71—133.
4. *Lippard S. J.* Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs // *Pure and Appl. Chem.*—1987.—59, N 6.—P. 731—742.
5. *Page J. D., Husain I., Sancar A., Chaney S. G.* Effects of the diaminocyclohexane carrier ligand on the platinum adduct formation, repair and lethality // *Biochemistry.*—1990.—29, N 4.—P. 1016—1024.
6. *Pillaire M. J., Margot A., Villani G. et al.* Mutagenesis in monkey cells of a vector containing a single d(GpG) cisdiaminedichloroplatinum (II) adduct placed on codon 13 of the human *H-ras* proto-oncogene // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 13.—P. 2519—2524.
7. *Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R.* Analysis of repeating DNA sequences by reassociation // *Meth. Enzymol.*—1974.—29, pt E.—P. 363—418.
8. *Прима В. И., Тарантул В. З., Шугалий А. В., Газарян К. Г.* Реассоциация ДНК: физические и биологические аспекты // *Укр. біохім. журн.*—1974.—46, № 2.—С. 255—271.

УДК 577.113.4

Поступила в редакцию 16.11.95