

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРДИАМИНОПЛАТИНЫ II НА СТРУКТУРУ ДНК-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА ¹

Чихиржина Е.^{1*}, Поляничко А.^{1,2*}, Костылева Е.¹, Воробьев В.¹

¹Институт цитологии РАН, С.-Петербург, ²Физический факультет СПбГУ, С.-Петербург, E-mail: chikhir@mail.cytspb.rssi.ru

*Авторы внесли равный вклад при подготовке работы.

В последние годы в медицинской практике в качестве противоопухолевых препаратов широко используются соединения, созданные на основе координационных соединений [1]. Среди них центральное место занимает цисплатин (*цис*-дихлордиаминоплатина(II), *цис*-ДДП). Несмотря на то, что многие клеточные компоненты могут взаимодействовать с *цис*-ДДП, основной мишенью для него остается ДНК. Атом платины после потери иона хлора образует ковалентные сшивки с седьмым атомом азота пуриновых оснований, образуя устойчивые внутринитевые и межнитевые платиновые аддукты на ДНК. Линкерный гистон Н1 и негистоновые хромосомные белки НМGB1/2 предпочтительно связываются с участками ДНК, расположенными вблизи таких платиновых аддуктов [1-3]. Эти белки по-разному взаимодействуют с ДНК. Положительно заряженный гистон Н1 локализуется в большой бороздке ДНК, экранируя заряды фосфатных групп [4]. При этом уменьшается жесткость двойной спирали и происходит ее изгиб в сторону большой бороздки. НМGB1 интеркалирует своими ароматическими аминокислотными остатками в малую бороздку и также изгибает ДНК до 140° [2].

Методами кругового дихроизма и абсорбционной спектроскопии были исследованы конформационные изменения в ДНК при взаимодействии с белками НМGB1 и Н1 в присутствии *цис*-ДДП. Было показано, что наличие платиновых аддуктов существенным образом меняет механизм связывания исследованных белков с ДНК.

В работе были использованы белки, выделенные из тимуса теленка путем экстракции 5% хлорной кислотой с последующим осаждением белков из раствора подкисленным ацетоном при -20°C.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 07-04-01072 и Гранта Президента РФ (МК-2126.2007.4), Программы "Ведущие научные школы России" (грант НШ-1961.2008.4).

Комплексы ДНК-ДДП были получены в растворе 15 мМ NaCl. Реакция была остановлена добавлением в раствор хлорида натрия до 150 мМ. Наблюдение за ходом реакции осуществлялось методом кругового дихроизма. Концентрация ДНК в растворе составляла 33 мкг/мл. ДНК-белковые комплексы готовились исходя из весового соотношения Γ белок/ДНК в растворе в диапазоне от 0 до 2,0.

При взаимодействии ДНК с гистоном Н1 в спектрах КД наблюдается постепенный переход к ψ -типу (*PSI* – Polymer and Salt Induced) спектра, который характеризуется наличием глубокой отрицательной или положительной полосы в области 270-285 нм [5]. Такое поведение спектра указывает на конденсацию ДНК, с образованием крупных рассеивающих ДНК-белковых комплексов [6]. Аналогичные изменения спектра КД мы наблюдали и при взаимодействии гистона Н1 с

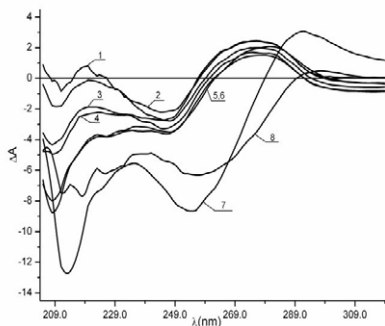


Рис. 1. Спектры КД комплексов *цис*-ДДП/ДНК (1:25) с линкерным гистоном Н1 в зависимости от соотношения Н1/ДНК: 1 - 0; 2 - 0,1; 3 - 0,25; 4 - 0,5; 5 - 0,75; 6 - 1; 7 - 1,25; 8 - 1,5

ДНК, модифицированной *цис*-ДДП (Рис. 1). Были проведены исследования структуры комплекса ДНК-Н1 при соотношениях *цис*-ДДП/ДНК 1:10; 1:25; 1:100. В данной работе представлены спектры растворов комплекса *цис*-ДДП/ДНК-Н1 при соотношении *цис*-ДДП/ДНК 1:25 (рис. 1). Уменьшение количества

платины, приходящегося на ДНК, не приводит к существенным изменениям в спектре КД. Интенсивность положительной полосы КД в области 270-280 нм, соответствующей изменениям структуры двойной спирали ДНК, при малых соотношениях белок/ДНК (Γ) уменьшается, что соответствует взаимодействию ДНК с Н1. Повышение содержания белка в комплексе вплоть до $\Gamma = 1$ приводит к сдвигу КД в длинноволновую область и к появлению мутности раствора, что проявляется в спектре КД в виде длинноволнового «хвоста». Анализ белковой полосы КД при 200-230 нм

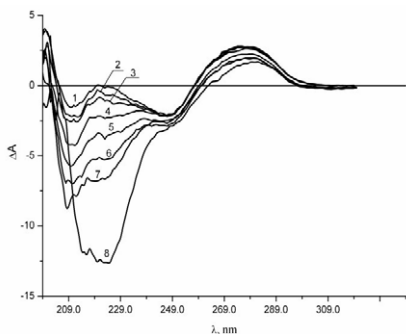


Рис. 2. Спектры КД комплексов *цис*-ДДП/ДНК (1:10) с белком HMGB1 в зависимости от соотношения HMGB1/ДНК: 1 - 0; 2 - 0,1; 3 - 0,25; 4 - 0,5; 5 - 0,75; 6 - 1; 7 - 1,25; 8 - 1,5

оказывается несущественным. Возникающий изгиб ДНК не дает возможности белку подойти к основаниям. Следует отметить, что с ростом степени платинирования ДНК конденсация комплекса наступает при меньших значениях g . Вероятно, это связано с тем, что увеличение степени платинирования стимулирует белок-белковые взаимодействия между молекулами гистона H1, связанными с удалёнными друг от друга участками ДНК, за счёт частых изгибов двойной спирали.

Характерные спектры КД для комплексов платинированной ДНК с белком HMGB1 представлены на рис. 2 и 3. При взаимодействии *цис*-ДДП/ДНК с HMGB1 в отличие от гистона H1, мы наблюдаем существенные изменения как в белковой полосе спектра КД при 200-230 нм, так и в области 260-280 нм, соответствующей КД ДНК. Анализ белковой полосы КД показывает, что при

показал, что при взаимодействии гистона с платинированной ДНК изменений структуры самого белка не наблюдается. Следовательно, механизм связывания гистона H1 с ДНК, модифицированной *цис*-платином, существенно отличается от такового в системе ДНК-H1. По всей видимости, вследствие возникновения на ДНК платинового аддукта в системе *цис*-ДДП/ДНК-H1 наблюдается взаимодействие белка лишь с отрицательно заряженными фосфатами ДНК, а взаимодействие с основаниями

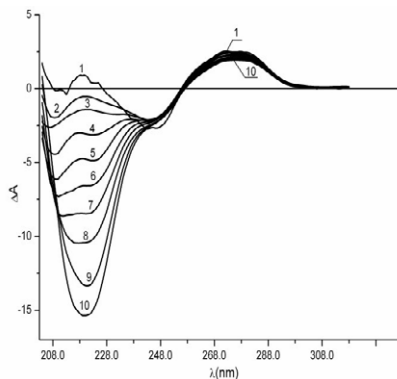


Рис.3. Спектры КД комплексов *цис*-ДДП/ДНК (1:25) с белком HMGB1 в зависимости от соотношения HMGB1/ДНК: 1 - 0; 2 - 0,1; 3 - 0,25; 4 - 0,5; 5 - 0,75; 6-1; 7 - 1,25; 8 - 1,5; 9 - 1,75; 10 - 2

взаимодействии HMGB1 с модифицированной *цис*-ДДП ДНК наблюдается изменение степени α -спиральности белка. Несмотря на то, что в спектрах этих систем так же может наблюдаться рассеяние, свидетельствующее о конденсации макромолекул комплекса, оно выражено слабее. Чем в комплексах с H1 и наблюдается только при очень больших соотношениях белок/ДНК в пробе. Необходимым условием для конденсации ДНК является экранировка отрицательных зарядов фосфатных групп, что становится возможным при связывании с ними положительно заряженной молекулы белка. В случае белка HMGB1, не обладающего большим положительным зарядом, на первое место выходят взаимодействия между самими белковыми молекулами. Оказалось, что платинирование ДНК приводит к существенному ослаблению, а иногда и к полному исчезновению рассеяния в системе. Следовательно, в данном случае мы наблюдаем уменьшение неспецифических белок-белковых взаимодействий в комплексе, что возможно при избирательном связывании HMGB1 с участками ДНК, поврежденными *цис*-ДДП. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что изменения в спектре белка, проявляющиеся при его связывании с ДНК, коррелируют со степенью платинирования самой ДНК, указывая на то, что взаимодействие белка HMGB1 с платинированной ДНК проходит более активно. Присутствие в ДНК-белковой системе *цис*-ДДП существенно ослабляет процессы конденсации молекул комплекса.

Таким образом, наличие платиновых аддуктов ДНК приводит к появлению качественных различий в характере взаимодействия белков HMGB1 и H1 с ДНК. В случае гистона H1 присутствие *цис*-ДДП стимулирует образование «скрепок» на ДНК, тогда как в комплексах с ДНК-HMGB1 количество межбелковых взаимодействий уменьшается за счет избирательного связывания белка с платиновыми аддуктами на ДНК.

Список литературы

1. Jamieson E. R., Lippard S. J. 1999. Chem. Rev. 99: 2467-2498.
2. Bustin M. 1999. Mol. Cell Biol. 19: 5237-5246.
3. Jamieson E. R., Jacobson M. P., Barnes C. M., Chow C., Lippard S. 1999. J. Biol. Chem. 274: 12346-12354.
4. Чихиржина Е. В., Воробьев В. И. 2002. Цитология. 44(8): 721-736.
5. Weiskopf M., Li H.J. 1977. Biopolimers. 16: 669-684.
6. Чихиржина Е. В., Костылева Е. И., Рамм Е. И., Воробьев В. И. 1998. Цитология. 40(10): 883-888.