

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱԲԳԱՐՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ՍԱՐԳՍԻ

ԴՆԹ-ի ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԵՏԱՂ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ
ՀԵՏ՝ ԵՐԿՎԱԼԵՆՏ ԻՈՆՆԵՐԻ, ՊԼԱՏԻՆԱՅԻՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԵՎ
ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՕՐԻՆԱԿՈՎ

Գ.00.02 - Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ
ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

Ե Ր Ե Վ Ա Ն - 2013

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АБГАРЯН ЛУСИНЕ САРКИСОВНА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИМИ
ЛИГАНДАМИ, НА ПРИМЕРЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ,
СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ И ПОРФИРИНОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук по специальности
03.00.02 - Биофизика

Е Р Е В А Ն - 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում
Գիտական ղեկավար՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր պրոֆեսոր
Ե.Բ.Դալյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Պ.Հ.Վարդևանյան
Ֆիզմաթ. գիտ. թեկնածու,
դոցենտ Գ.Ա. Մանուկյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Վրաստանի ԳԱ Ֆիզիկայի Ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2013թ. մայիսի 30-ին
ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի
Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք
Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի
գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2013 ապրիլի 29-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր

Լ.Հ.Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор физ.- мат. наук профессор
Е.Б.Далян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук,
профессор П.О.Вардеванян
кандидат физ.- мат. наук,
доцент Г.А. Манукян

Ведущая организация:

Институт физики АН Грузии

Защита диссертации состоится 30 мая 2013г., в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета ВАК РА Биофизика 051 при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 29 апреля 2013 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, профессор

Լ.Ա.Նավասարդյան

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Ионы металлов оказывают существенное влияние на все уровни организации ДНК – от первичной структуры до ее пространственной организации в составе хромосом. С одной стороны, наличие ионов щелочноземельных и переходных металлов необходимо для нормального протекания процессов репликации, транскрипции и трансляции. С другой стороны известно, что ионы некоторых металлов (таких, как Cr(II), Ni(II), Mn(II), Cu(II)) являются сильными мутагенами и канцерогенами. Так, при избыточном количестве ионов Mn^{2+} и Cu^{2+} число мутлирующих бактерий и бактериофагов увеличивается в сотни раз, а образование злокачественных опухолей сопровождается увеличением содержания металлов не только в белках, но и в ДНК раковых клеток (*Э.Л.Андроникашвили, 1987*). Все это определяет большой интерес к изучению комплексов ионов переходных металлов с ДНК, особенно в связи с возрастанием загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

Наряду с этим ионы и комплексы некоторых металлов (Pt(II), Au(III) и Ru(III)) обладают противоопухолевым действием, в частности сильную терапевтическую активность имеет соединение платины *cis*-diaminedichlorplatinum (*cis*-DDP). Поэтому во многих лабораториях интенсивно занимаются исследованием механизмов связывания *cis*-DDP с ДНК. Установлено, что *cis*-DDP может ковалентно связываться с ДНК несколькими способами. (*Lippard S.J. 2005, V.Brabec, 2001*). Предполагается, что основной терапевтический эффект *cis*-DDP - образование межнитевых сшивок в двойной спирали ДНК, благодаря чему при делении клетки нити ДНК не могут разойтись. Поэтому исследование влияния на *cis*-DDP–ДНК комплекс УФ- облучения, как еще одного агента, который образует сшивки в нитях ДНК, может дать дополнительную информацию о таком механизме связывания *cis*-DDP с ДНК.

Однако, *cis*-DDP является довольно токсичным соединением, и поэтому ведутся разработки по нахождению менее токсичных протеевоопухолевых препаратов. К разряду таких соединений относятся порфирины и металлопорфирины, которые, в отличие от *cis*-DDP, обратимо связываются с ДНК. Известно, что порфирины и металлопорфирины связываются с ДНК также несколькими механизмами (*Pasternack R.F., Gibbs E.J., 1996*). *In vitro* механизм связывания с ДНК конкретного порфирина можно определить спектральными методами (абсорбционная спектрофотометрия и КД), но остается под вопросом, проникают ли эти соединения в клетку. Для выяснения этого вопроса нами был применен новый подход, основанный на использовании метода двухфотонной микроскопии.

Целью данной работы является: исследование термодинамических особенностей связывания ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} с ДНК, исследование воздействия УФ-излучения на структуру и термодинамику комплекса *cis*-DDP-ДНК, а

также исследование особенностей взаимодействия Ag(II)–содержащего мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (AgТОЕРуР) и его Zn(II)- и Co(II)-содержащих аналогов, (ZnТОЕРуР и CoТОЕРуР) со здоровыми и мутированными (раковыми) клетками.

Для выполнения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Определение структурных и термодинамических особенностей связывания ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} на ДНК методом адиабатической микрокалориметрии и сравнение этих результатов со спектрофотометрическими данными.
2. Исследование воздействия УФ-облучения на термодинамические параметры (температура и энтальпия) перехода спираль-клубок комплекса cis-DDP-ДНК на базе микрокалориметрических кривых плавления.
3. Изучение особенностей связывания AgТОЕРуР, ZnТОЕРуР, CoТОЕРуР порфиринов с живыми клетками методом двухфотонной флуоресцентной микроскопии. Выявление корреляции между типом центрального металла в металлопорфирине и механизмом его связывания с клеткой.
4. Сравнительное исследование цитотоксичности AgТОЕРуР, ZnТОЕРуР, CoТОЕРуР порфиринов по отношению к здоровым и раковым клеткам.

Научная новизна

1. На основе сравнительного анализа результатов спектрофотометрических и микрокалориметрических измерений получены экспериментальные доказательства образования внутримолекулярных агрегатов в GC-богатых областях ДНК в присутствии стехиометрических концентраций ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} .
2. Исследовано воздействие УФ-облучения на термодинамику комплекса cis-DDP-ДНК. Найдены оптимальные условия (концентрации cis-DDP и рациональные времена УФ-облучения), приводящие к стабилизации ДНК и образованию межнитевых сшивок.
3. Впервые исследовано действие новых порфиринов AgТОЕРуР, ZnТОЕРуР, CoТОЕРуР на клетки Ваf3, которые известны как устойчивые к cis-DDP.
4. Впервые для изучения локализации AgТОЕРуР, ZnТОЕРуР, CoТОЕРуР порфиринов в живых клетках использован метод двухфотонной микроскопии.
5. Проведен сравнительный анализ цитотоксичности этих порфиринов по отношению к здоровым и раковым клеткам.

Основные положения выносимые на защиту.

1. В присутствии низких стехиометрических концентраций ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} происходит избирательная дестабилизация GC-пар ДНК,

- сопровождающаяся образованием внутримолекулярных агрегатов в GC-богатых областях ДНК.
2. При плавлении комплекса ДНК с ионами Ni^{2+} сначала плавится основная фракция ДНК, и только после нее разрушаются внутримолекулярные агрегаты в более термостабильных GC-богатых областях.
 3. Связывание с ионами Cu^{2+} приводит к инверсии термостабильностей AT и GC-пар, в результате чего GC-пары плавятся раньше, чем AT-пары. При плавлении комплекса ДНК с ионами Cu^{2+} сначала разрушаются агрегаты в ставших менее стабильными GC-богатых областях, а затем плавится основная фракция ДНК.
 4. При низких концентрациях cis-DDP воздействие УФ-облучения на ДНК уменьшается (энтальпия плавления увеличивается). Частичное поглощение УФ-энергии cis-DDP не только уменьшает прямой эффект УФ-облучения ДНК, но и уменьшает количество образованного вследствие УФ-облучения синглетного кислорода. А уменьшение синглетного кислорода уменьшает образование разрывов в ДНК из-за УФ-облучения.
 5. При высоких концентрациях cis-DDP, когда существенная часть ДНК находится в A-форме, образование дефектов в ДНК при УФ-облучении облегчается (энтальпия плавления уменьшается).
 6. Установлено, что порфирины с разными центральными металлами влияют на клетки по разному. При относительно высоких концентрациях AgТОЕРуР порфирины проникают в клетку и локализуются в нескольких местах внутри клетки. СоТОЕРуР порфирины локализуются в специфичных областях на поверхности мембраны, практически не проникая внутрь клетки. ZnТОЕРуР порфирины локализуются избирательно в одном месте на мембране клетки.
 7. Показано, что AgТОЕРуР и ZnТОЕРуР порфирины обладают высокой селективной токсичностью по отношению к раковым клеткам, а СоТОЕРуР порфирин нет.

Научная и практическая ценность работы.

Научную ценность прежде всего представляет то, что на основании термодинамических исследований получены экспериментальные доказательства образования внутримолекулярных агрегатов в ДНК при низких стехиометрических концентрациях ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} . В диссертации получены также новые данные о влиянии УФ-облучения на термодинамику плавления комплекса известного противоопухолевого препарата цисплатин с ДНК, что позволяет лучше понять принцип противоопухолевого действия этого препарата и прогнозировать биологическое действие аналогичных соединений.

Практическая ценность работы определяется прежде всего тем, что изученные в настоящей работе соединения являются противоопухолевыми и потенциально противоопухолевыми препаратами, и любые данные о взаимодействии таких соединений с биообъектами имеет огромное значение. В частности, в работе методом двухфотонной микроскопии впервые получены трехмерные фотографии локализации этих порфиринов в клетках. Выявлены порфирины (AgТОЕРуР и ZnТОЕРуР), обладающие селективной цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам.

Полученные результаты используются на кафедре молекулярной физики Ереванского государственного университета при изучении структуры комплексов нуклеиновых кислот с различными типами лигандов. Результаты, полученные в данной работе по изучению ДНК-порфирин комплексов используются на кафедре фармакологической химии Ереванского государственного медицинского университета для целенаправленного синтеза новых порфиринов с повышенной биологической активностью с целью их использования в медицине и сельском хозяйстве.

Апробация работы.

Материалы диссертации обсуждались на семинарах кафедры молекулярной физики ЕГУ и докладывались на следующих конференциях:

- “Current Trends in Microcalorimetry 2005” (Boston,USA 2005);
- “Современные проблемы молекулярной биофизики” (Санкт-Петербург 2006);
- “XIII Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул” (Санкт-Петербург 2006);
- “Current Trends in Microcalorimetry 2007” (Boston,USA, 2007);
- “The 3rd Imaging in Preclinical and Clinical Drug Development” (San-Diego USA, 2008);
- "JBSD Conversation 16-Albany" (Albany,USA, 2009);
- “Biotechnology and health-3” & DAAD Alumni seminar (Armenia, 2009);
- “Solvation and Ionic Effects in Biomolecules: Theory to Experiment” (Armenia, 2010).

Публикации.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 (4 статьи и 4 тезиса), список которых приводится в конце автореферата.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы из 145 наименований. Общий объем работы – 106 страниц, включая 35 рисунков и 2 схемы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована цель диссертационной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе диссертационной работы подробно описаны объекты исследования – нуклеиновые кислоты, двухвалентные ионы, платиносодержащие комплексы, УФ-излучение и порфирины, изложен литературный обзор теоретических и экспериментальных исследований, относящихся к теме диссертации.

Раздел 1.1 посвящен конформации и термостабильности нуклеиновых кислот.

В разделе 1.2 рассматривается воздействие УФ-излучения на ДНК.

В разделе 1.3 описывается взаимодействие ДНК с металл-содержащими комплексами.

В разделе 1.3.1 описывается взаимодействие ДНК с двухвалентными ионами металлов первого переходного ряда.

В разделе 1.3.2 описывается взаимодействие платиносодержащих комплексов с ДНК.

В разделе 1.3.3 описывается взаимодействие ДНК с порфиринами.

Во второй главе диссертационной работы приводится описание использованных в работе материалов и методов.

В разделе 2.1 описаны использованные материалы. Ag(II), Co(II) и Zn(II)-содержащие производные мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил)порфирина (ТОЕРуР4) были синтезированы проф. Робертом Казаряном в ЕМГУ путем алкализации мезо-тетра-(4N-пиридил) порфирина (схема 1). Молекулярные массы AgТОЕРуР, CoТОЕРуР и ZnТОЕРуР равны, соответственно, 1152Da, 995.16Da и 1000.15Da.

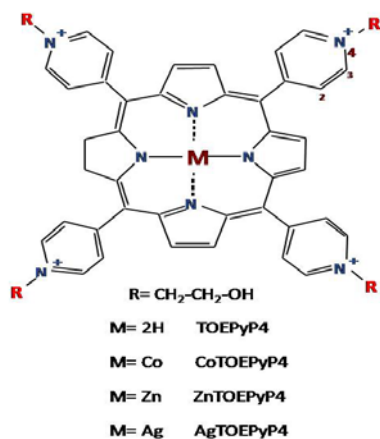


Схема 1. Структурная формула порфиринов

В разделе описана методика определения цитотоксичности препаратов. К равным количествам клеток добавлялись разные концентрации порфиринов. Для каждой дозы порфирина число клеток равнялось 60000 или 300 μl от 200000 клеток. Концентрации изученных порфиринов изменялись от 300 μM до 0.4 μM с коэффициентом разбавления 3 (всего 7 концентрационных точек). Исследования проводились на про-В-клетках, выделенных из костного мозга. Клетки выращивались в растворе, содержащем RPMI с 10 % FBS (fetal bovine serum), IL-3 (фактор

роста), пенициллин и стрептомицин. Для вычисления и классификации живых и мертвых клеток был использован краситель Trypan Blue.

В работе был использован сверхчистый препарат ДНК тимуса теленка (GC-содержание 42%), выделенный в ИБОХ АН Республики Беларусь проф.Д.Ю.Ландо (содержание РНК < 0.1%, содержание белка < 0,2 %, молекулярная масса ДНК - 3×10^7 Да). Концентрация ДНК определялась спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции: $\epsilon_{260} = 13860 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Концентрация ДНК в калориметрических измерениях составляла $\sim 10^{-3}$ М.

При исследовании связывания ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} с ДНК в качестве буферного раствора использовали в 10^{-3} М NaCl. Ионы металла вводились в раствор 10^{-3} М NaCl в виде солей CuCl_2 и NiCl_2 . Относительную концентрацию ионов (r) определяли в расчете на 1 нуклеотид (М/Р) (где М/Р = концентрация ионов (в М)/ концентрация нуклеотидов ДНК (в М)). Область исследованных относительных концентраций: $0.025 \div 0.5$ М/Р для ионов Cu^{2+} и $0.025 \div 2$ М/Р для ионов Ni^{2+} .

Для исследования ДНК-cis-DDP взаимодействий в работе использовался коммерческий препарат cis-DDP (Sigma), растворенный в буферном растворе, содержащем 10^{-2} М NaClO_4 и 10^{-3} М NaCl. Готовился маточный раствор cis-DDP концентрации 10^{-3} М, который затем разбавлялся буфером до требуемых концентраций (10^{-9} - 10^{-4} М). Начальная концентрация ДНК при калориметрических измерениях была 0.7 mg/ml (10^{-3} М пар оснований). Для каждого эксперимента смешивались одинаковые объемы раствора ДНК и cis-DDP, тем самым делая конечные концентрации ДНК и соответственно cis-DDP в 2 раза меньше. Конечный раствор ДНК-cis-DDP инкубировался 48 часов при температуре 4°C до УФ-облучения. Термическая денатурация образцов проводилась сразу же после облучения. Для УФ-облучения образцов использовался стандартный прибор Medicor Q-139.

Для обработки и построения экспериментальных кривых использовалась программа Origin 6.1 (OriginLab Corporation). Для расчетов параметров плавления, также для анализа цитотоксичных эффектов использовались стандартные пакеты Microsoft Excel, а также программы, написанные на языке Visual Basic параллельно с программой GraphPad Prism 4.1 (© GraphPad Software, Inc.) для конечной нелинейной подгонки экспериментальных кривых цитотоксичности.

В разделе 2.2 описан метод дифференциальной адиабатической сканирующей микрокалориметрии. Калориметрические измерения были выполнены на Микрокалориметре ДАСМ-4. Температура менялась от 10 °С до 100 °С со скоростью 1 °С/min.

В разделе 2.3 описан метод двухфотонной микроскопии. Для наших экспериментов была использована система с Mai-Tai (New Port Corporation) фемтосекундным осциллятором и Leica микроскопом, оснащенным ХУ-

гальваносканером для получения двумерного изображения в фокальной плоскости образца.

Результаты и Осуждение

Третья глава посвящена исследованию взаимодействия металлсодержащих лигандов с ДНК.

В разделе 3.1 исследуются особенности взаимодействия низких стехиометрических концентраций ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} с ДНК.

Раздел 3.1.1 посвящен исследованию термодинамики комплексообразования стехиометрических концентраций ионов Ni^{2+} с ДНК. На рисунке (рис.1а) приведены микрокалориметрические кривые плавления Ni^{2+} -ДНК комплексов при различных концентрациях ионов.

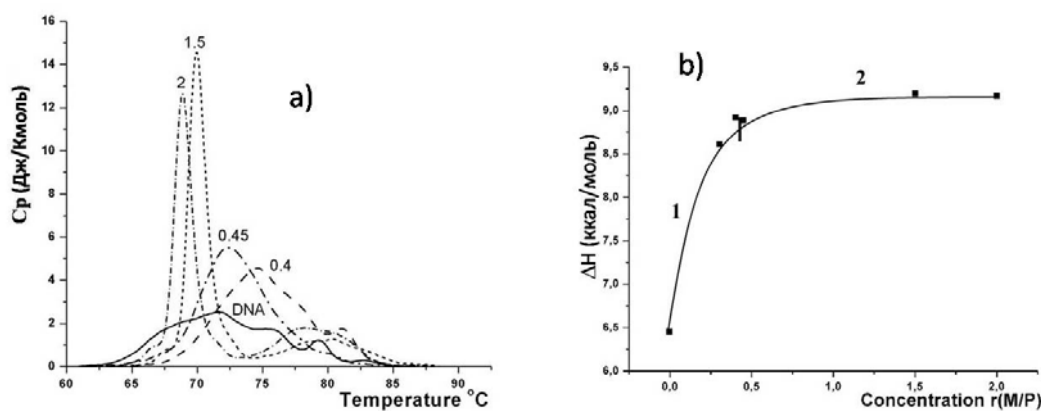


Рис.1. а) Микрокалориметрические кривые плавления ДНК тимуса теленка в 10^{-3}M NaCl при различных относительных концентрациях ионов Ni^{2+} (цифры у кривых). б) Кривая зависимости энтальпии плавления ДНК- Ni^{2+} комплекса от концентрации ионов Ni^{2+} .

Как видно из рисунка до концентраций $r \leq 0.5\text{M/P}$ ионы Ni^{2+} взаимодействуют с фосфатными группами ДНК и стабилизируют двойную спираль ДНК, выполняя роль противоионов. При более высоких концентрациях ($r > 0.5\text{M/P}$), когда ионы избирательно дестабилизируют GC-пары, наблюдается изменение формы кривой плавления. Кривая плавления принимает форму двух разведенных по температурной шкале пиков: большой низкотемпературный пик, соответствующий выплавлению основной фракции ДНК и широкий малоинтенсивный пик при более высоких температурах (в области плавления GC-богатых участков). С увеличением концентрации ионов наблюдается уменьшение интенсивности и температуры максимума основного пика и увеличение интенсивности второго. Аналогичные изменения наблюдались ранее в присутствии ионов двухвалентных металлов переходного ряда на спектрофотометрических дифференциальных кривых плавления ДНК (Далян, 2003), и было высказано предположение, что

высокотемпературный пик обусловлен внутримолекулярной агрегацией в GC-богатых участках ДНК при связывании с такими ионами.

На рисунке (1b) приведены рассчитанные из этих экспериментов зависимости энтальпии плавления комплекса от концентрации ионов Ni^{2+} . Увеличение энтальпии плавления при $r \leq 0.5\text{M/P}$ (участок 1) соответствует связыванию ионов с фосфатными группами, приводящее к стабилизации структуры ДНК. При более высоких стехиометрических концентрациях ($0.5\text{M/P} \leq r \leq 2\text{M/P}$) с увеличением концентрации ионов Ni^{2+} суммарная энтальпия системы не меняется (участок 2).

Полученный результат можно объяснить, если суммарную энтальпию плавления представить как суперпозицию двух эффектов: энтальпии плавления основной фракции ДНК (низкотемпературный пик) и энтальпии разрушения внутримолекулярных агрегатов в GC-богатых областях ДНК, на плавление которых тратится определенная энергия (высокотемпературный пик). С увеличением концентрации ионов Ni^{2+} на фоне дестабилизации основной фракции ДНК число агрегатов в GC-богатых областях становится больше, и, соответственно, увеличивается энергия, необходимая на распад этих агрегатов. В результате суммарная энтальпия плавления системы не меняется.

Раздел 3.1.2 посвящен исследованию термодинамики комплексообразования стехиометрических концентраций ионов Cu^{2+} с ДНК (Рис. 2). В отличие от ионов Ni^{2+} , добавление к ДНК ионов Cu^{2+} приводит к сдвигу кривой плавления в сторону низких температур даже при концентрациях $r \leq 0.5\text{M/P}$ (Рис. 2а), что свидетельствует об их взаимодействии с основаниями ДНК. Изменение формы кривой плавления ДНК при связывании с ионами Cu^{2+} сильно зависит от концентрации иона: с увеличением концентрации ионов до $r=0.2\text{ M/P}$ наблюдается тенденция к слиянию высокотемпературных пиков, свидетельствующая о выравнивании термостабильностей AT и GC-пар в результате избирательной дестабилизации GC-пар (на рисунке кривые не приведены). Начиная с концентрации ионов Cu^{2+} $r=0.35\text{M/P}$, как видно из рисунка 2а, наблюдается инверсия кривой плавления – т.е. GC-богатые участки начинают плавиться раньше, чем AT-богатые. Аналогичный результат был получен и на дифференциальных кривых плавления, однако концентрация инверсии при спектрофотометрическом плавлении была почти вдвое выше.

Как видно из рисунка 2а при относительно высоких концентрациях (начиная с $r=0.4$ и 0.45 M/P) всю кривую плавления можно разделить на две части: 1) высокотемпературный пик, который уменьшается с ростом концентрации ионов, и 2) низкотемпературный пик, который становится очень интенсивным с ростом концентрации. Как и в случае ионов Ni^{2+} мы полагаем, что первый пик соответствует выплавлению основной фракции ДНК, а второй пик обусловлен разрушением внутримолекулярных агрегатов в GC-богатых участках.

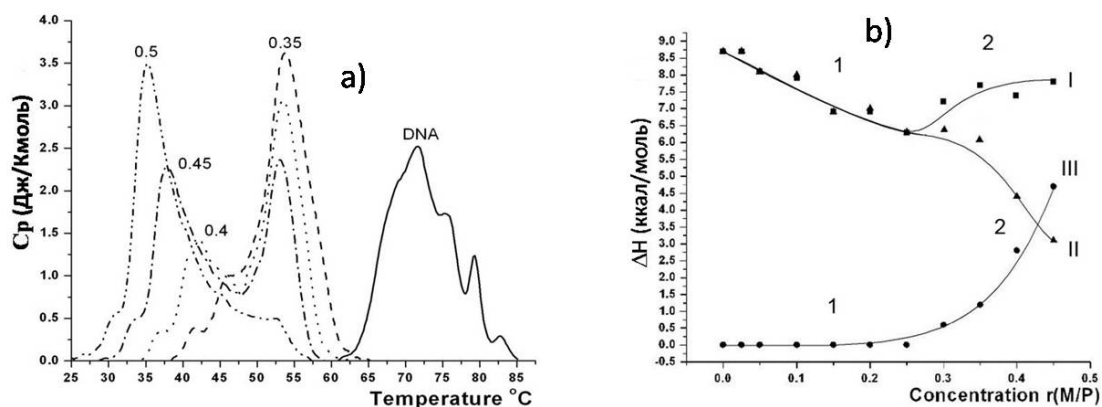


Рис. 2. а) Микрокалориметрические кривые плавления ДНК тимуса теленка в 10^{-3}M NaCl при различных концентрациях ионов Cu^{2+} . б) Кривая зависимости энтальпии плавления ДНК- Cu^{2+} комплекса от концентрации ионов Cu^{2+} .

На рисунке 2б) приведены зависимость энтальпии перехода ДНК- Cu^{2+} комплекса от концентрации ионов Cu^{2+} . Из рисунка видно, что суммарная энтальпия перехода ДНК- Cu^{2+} комплекса с увеличением концентрации ионов сначала уменьшается, а затем увеличивается (кривая I). При $r=0.35$ М/Р кривая проходит через минимум. Как и в случае Ni^{2+} , суммарную энтальпию плавления можно представить как суперпозицию двух эффектов: энтальпии плавления основной фракции ДНК (кривая II) и энтальпии разрушения агрегатов, образующихся между GC-парами в GC-богатых областях ДНК (кривая III). Энтальпия плавления основной фракции ДНК (кривая II) с ростом концентрации ионов Cu^{2+} уменьшается (как и в случае ионов Ni^{2+}), поскольку при связывании с ионами Cu^{2+} ДНК дестабилизируется. До концентраций ионов Cu^{2+} $r=0.2$ М/Р агрегационные эффекты невелики и доминирует этот эффект. При более высоких концентрациях ионов Cu^{2+} вклад агрегационных эффектов становится более существенным и соответствующая им энтальпия плавления агрегатов в GC-богатых участках ДНК заметно растет.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что характеры плавления комплексов ДНК с Cu^{2+} и Ni^{2+} ионами принципиально различаются. При плавлении комплекса ДНК с ионами Ni^{2+} сначала плавится основная фракция ДНК, и только после нее разрушаются внутримолекулярные агрегаты в более термостабильных GC-богатых областях. А при плавлении комплекса ДНК с ионами Cu^{2+} сначала разрушаются агрегаты в GC-богатых областях, а затем плавится основная фракция ДНК, так как избирательная дестабилизация GC-пар при связывании с ионами Cu^{2+} приводит к инверсии термостабильностей AT и GC-пар, в результате чего GC-богатые участки плавятся раньше, чем AT-богатые.

Раздел 3.2 посвящен исследованию влияния УФ облучения на комплексообразование *cis*-DDP с ДНК.

В разделе 3.2.1 исследуется взаимодействие *cis*-DDP с ДНК. По данным микрокалориметрических измерений были рассчитаны значения энтальпии плавления комплексов *cis*-DDP с ДНК при различных концентрациях *cis*-DDP. На рис.3а приведена кривая зависимости энтальпии плавления необлученных ДНК-*cis*-DDP комплексов от концентрации *cis*-DDP.

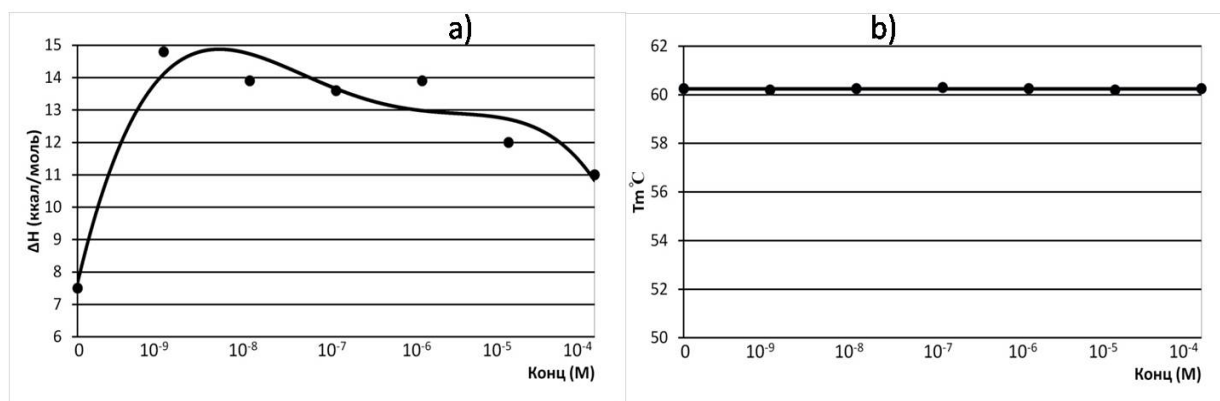


Рис. 3. Энтальпия плавления (а) и температура плавления (б) ДНК-*cis*-DDP комплексов в зависимости от концентрации *cis*-DDP без УФ излучения.

Как видно из рисунка зависимость энтальпии перехода от концентрации *cis*-DDP носит немонотонный характер. Уже при концентрации *cis*-DDP 10^{-9} М (когда 1 молекула платины приходится примерно на 100000 нуклеотидов) энтальпия плавления комплекса резко увеличивается с $\Delta H=7.5$ ккал/моль до $\Delta H=14.8$ ккал/моль. Затем при концентрациях 10^{-8} - 10^{-6} М значение энтальпии уменьшается на 1 ккал/моль. Выше концентрации 10^{-6} М энтальпия комплекса уменьшается, но при этом оставаясь существенно более высокой, чем при нулевой концентрации платины ($\Delta H=11$ ккал/моль). Температура плавления (под которой мы подразумеваем температуру максимума основного пика калориметрической кривой перехода спираль-клубок ДНК) комплекса при всех концентрациях *cis*-DDP остается постоянной и равной $60.3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Рис.3б).

Рост энтальпии плавления при низких концентрациях платины скорее всего обусловлен предпочтительным образованием межнитевых сшивок в ДНК, затрудняющих расхождение нитей ДНК при плавлении. При более высоких концентрациях энтальпия комплекса уменьшается, поскольку наряду с межнитевыми сшивками с ростом концентрации платины увеличивается доля неспецифических взаимодействий *cis*-DDP в последовательностях типа d(GpXpG) (Brabec V et al. 1992), приводящих к однонитевым и, возможно, двунитевым разрывам в ДНК.

В разделе 3.2.2 исследуется влияние УФ-облучения на термодинамику комплексообразования *cis*-DDP с ДНК. Исследования проводились при 10- и 20-минутном УФ-облучении комплекса ДНК-*cis*-DDP одним и тем же источником излучения и в одинаковых условиях. На рисунке 4а представлена кривая зависимости энтальпии плавления ДНК от концентрации *cis*-DDP при 10-минутном УФ-облучении.

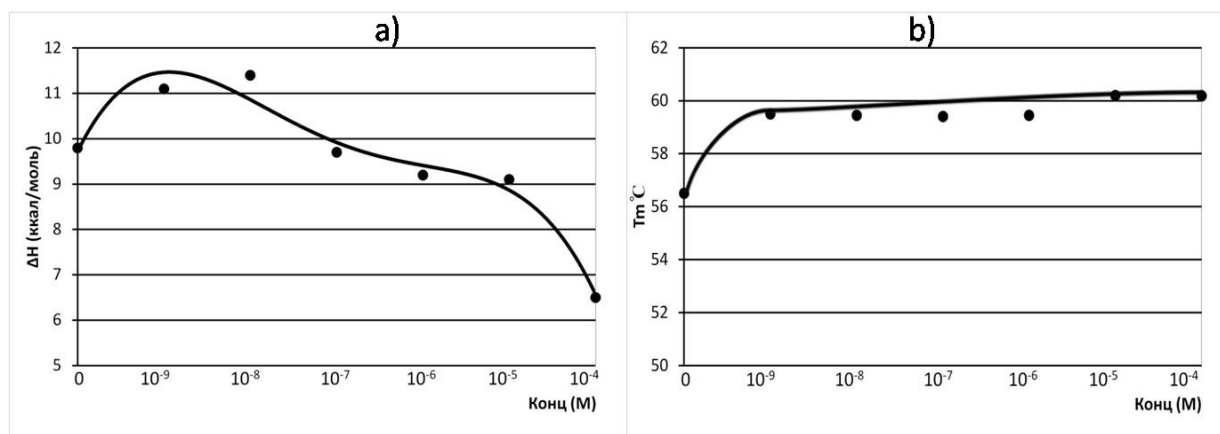


Рис. 4. Энтальпия плавления (а) и температура плавления (б) ДНК- *cis*-DDP комплекса в зависимости от концентрации *cis*-DDP при 10-минутном УФ-облучении.

Как видно из рисунка 4а профиль зависимости энтальпии перехода от концентрации платины в целом сохраняется таким же, как для необлученных образцов (рис.3а). Однако кривая зависимости энтальпии перехода облученного комплекса ДНК-*cis*-DDP от концентрации *cis*-DDP проходит существенно ниже, чем для необлученного (наибольшее значение энтальпии $\Delta H=11.5$ ккал/моль наблюдается при концентрации *cis*-DDP 10^{-8} М). Иначе говоря, 10-минутное УФ-облучение понижает энтальпию комплекса ДНК-*cis*-DDP практически для всех концентраций *cis*-DDP. Наиболее вероятно, что при низких временах облучения в ДНК образуются тиминовые димеры, и, как следствие, в таких участках образуются небольшие петли, приводящие к дестабилизации спиральной структуры, и энтальпия плавления падает.

Профиль температуры плавления ДНК-*cis*-DDP комплекса при 10 минутном УФ облучении приведен на рисунке 4б. Если сравнить с профилем аналогичной зависимости для необлученных образцов, то видим, что температура плавления ДНК при нулевой концентрации *cis*-DDP уменьшается от 60°C до 57°C . Подобная дестабилизация может быть следствием образования тиминовых димеров в ДНК, не содержащей *cis*-DDP. Но уже при минимальной концентрации *cis*-DDP (10^{-9} М) температура плавления комплекса ДНК-*cis*-DDP увеличивается до 59.8°C . Скорее всего, в присутствии даже небольшого количества *cis*-DDP количество фотопродуктов при облучении уменьшается. Это означает, что на структуру ДНК доминирующим является эффект *cis*-DDP и это приводит к росту температуры плавления.

При концентрациях *cis*-DDP 10^{-6} М- 10^{-4} М T_m увеличивается почти до значений, характерных для необлученной ДНК. Подобное увеличение скорее всего обусловлено тем, что при этих концентрациях вблизи мест связывания *cis*-DDP с ДНК могут образоваться межнитевые сшивки между тиминами противоположных цепей (образуется 6-дигидро-5-(α -тиминил)-тимин). Установлено, что подобные сшивки происходят преимущественно в ДНК, находящейся в А-форме (Cadet J. et al, 1997). Поскольку хорошо известно, что связывание *cis*-DDP с ДНК приводит к локальным В-А переходам в ДНК в местах связывания, то вероятность образования межцепочечных сшивок между тиминовыми нуклеотидами противоположных нитей ДНК при таких высоких концентрациях *cis*-DDP весьма велика, однако недостаточна для существенного изменения энтальпии плавления (Рис. 4.а).

Более длительное 20-минутное УФ-облучение ДНК-*cis*-DDP комплекса принципиально меняет профиль зависимости энтальпии системы от концентрации лиганда (рис. 5а). Для объяснения полученного результата вспомним, что при УФ-облучении водных растворов энергия УФ-излучения поглощается молекулами кислорода. Обычно молекула кислорода находится в триплетном состоянии (3O_2). Под действием УФ-облучения триплетный кислород может перейти в синглетное состояние ($^1O_2^*$). Синглетный кислород, в отличие от триплетного, обладает большой энергией, которая способна разрушить фосфодиэфирные связи скелета ДНК. Уменьшение энтальпии при очень малых ($\sim 10^{-9}$ М) концентрациях *cis*-DDP (рис. 5а) скорее всего является преобладающим эффектом образования достаточного количества синглетного кислорода, необходимого для разрушения нитей ДНК.

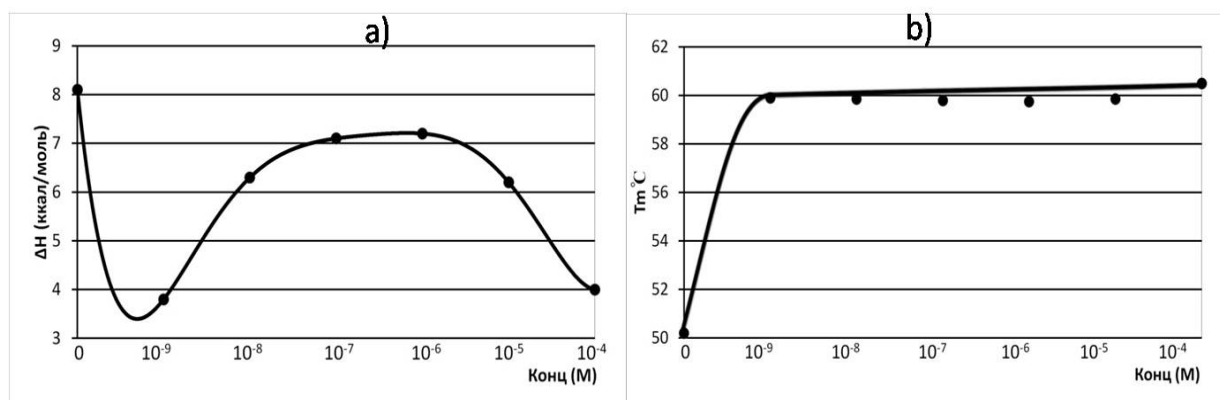


Рис. 5. Энтальпия плавления (а) и температура плавления (б) ДНК- *cis*-DDP комплекса в зависимости от концентрации *cis*-DDP при 20-минутном УФ-облучении.

Последующее увеличение концентрации *cis*-DDP от 10^{-8} М до 10^{-6} М, приводит к увеличению энтальпии плавления ДНК. Это может быть связано с образованием 6-дигидро-5-(α -тиминил)-тимина при этих концентрациях *cis*-DDP, которое приводит к повышению стабильности ДНК. Однако при этих концентрациях стабилизирующий эффект образования 6-дигидро-5-(α -

тиминил)-тимина при облучении минимальный, поскольку разрыв нитей ДНК при облучении может привести к удалению части молекул *cis*-DDP с ДНК и, соответственно, увеличению доли ДНК, находящейся в В-форме. Уменьшение значения ΔH при еще больших концентрациях *cis*-DDP (10^{-6} М- 10^{-4} М), по-видимому обусловлено конкурирующим действием противоположных эффектов, приводящих к уменьшению стабильности комплекса. Это: 1) увеличение вероятности специфических взаимодействий *cis*-DDP с ДНК с увеличением концентрации *cis*-DDP, 2) увеличение вероятности разрывов цепей ДНК под воздействием УФ-облучения и 3) уменьшение количества связанной платины из-за разрывов цепей ДНК при УФ-облучении. При достаточно высоких концентрациях платины и больших временах УФ-облучения вклад этих эффектов становится преобладающим и энтальпия падает. Зависимость температуры плавления от концентрации платины при 20-минутном УФ-облучении образцов практически такая же как при 10-минутном облучении. С одной лишь разницей - температура плавления ДНК без платины при 20-минутном УФ-облучении заметно ниже по сравнению с необлученной ДНК, по-видимому из-за образования тиминových сшивок и разрывов нитей ДНК (Рис. 5b).

В Разделе 4.1 исследуется взаимодействие AgТОЕРуР, ZnТОЕРуР и СоТОЕРуР порфиринов с живыми клетками методом двухфотонной микроскопии. Главным преимуществом двухфотонной микроскопии по сравнению с классической конфокальной микроскопией является то, что для оптического возбуждения используется фемтосекундный лазер с длиной волны в инфракрасной области, что позволяет исследовать биологические ткани на достаточно большой глубине (до 800 мк) и затем на основании полученных мультифотонным XYZ сканированием пикселей сложить суммарную 3-мерную картину. Эта процедура была проделана для обработанных разными дозами порфиринов клеток. Для установления эмиссионного пика данных порфиринов материал облучали лазером с длиной волны 880 нм, а полученный сигнал флуоресценции собирали сканированием по длине волны в диапазоне от 586.17 нм до 721.91 нм. Как видно из рисунка 6 эмиссионный пик наблюдается при длине волны 660 нм. Все дальнейшие исследования проникновения порфиринов в клетку проводились на полосе 660 нм.

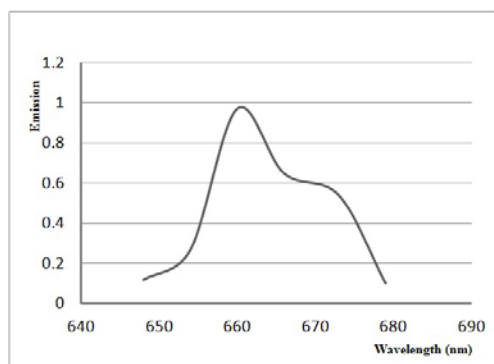


Рис. 6. Спектр эмиссии порфиринов

При добавлении на клетки малых концентраций порфиринов наблюдается равномерный флуоресцентный сигнал по всей поверхности клетки, что указывает на то, что все три порфирина одинаковым образом равномерно распределяются на

мембране клетки. А при высоких концентрациях, как видно на рисунке 7, исследуемые порфирины ведут себя строго индивидуально.

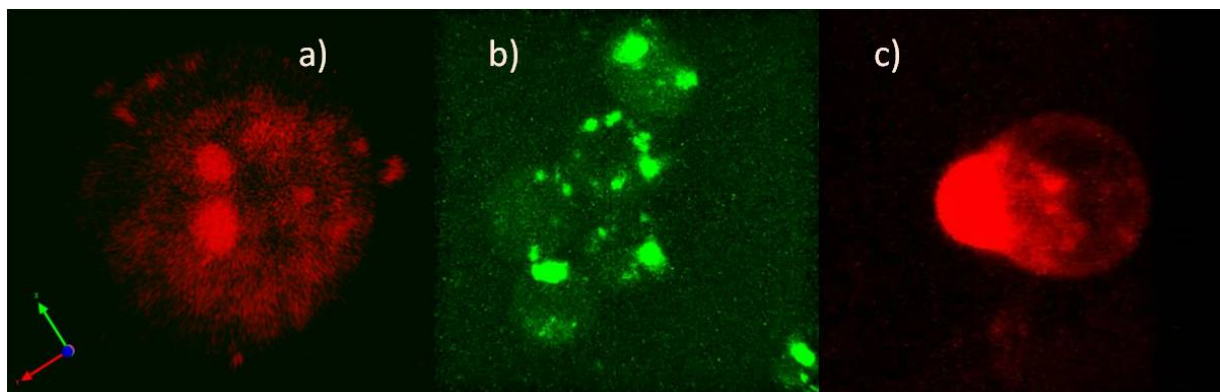


Рис. 7. Локализация AgTOEPyP (a), CoTOEPyP (b) и ZnTOEPyP (c) порфиринов в клетках.

Для AgTOEPyP помимо сильного сигнала с поверхности клетки, наблюдается также сильный сигнал в некоторых локальных областях внутри клетки (рис 7a). CoTOEPyP порфирины локализуются на нескольких специфичных областях мембраны, практически не проникая внутрь клетки (Рис.7b). ZnTOEPyP порфирины локализуются на одном месте на мембране клетки (Рис.7c).

В Разделе 4.2 исследуется цитотоксический эффект AgTOEPyP ZnTOEPyP, CoTOEPyP порфиринов на живые клетки Vaf3, которые известны своей устойчивостью к cis-DDP. Как видно из рис. 8a, низкие концентрации AgTOEPyP ($< 5 \cdot 10^{-6}$ M) практически не токсичны по отношению к здоровым клеткам, но сильно токсичны по отношению к раковым. Подобная селективная цитотоксичность по отношению к раковым клеткам наблюдается и для ZnTOEPyP - как видно из рис.8с при максимально низкой концентрации ZnTOEPyP степень выживания раковых клеток составляет не более 30%.

В отличие от предыдущих двух порфиринов цитотоксичность CoTOEPyP одинакова как по отношению к раковым клеткам, так и по отношению к здоровым (рис.8b).

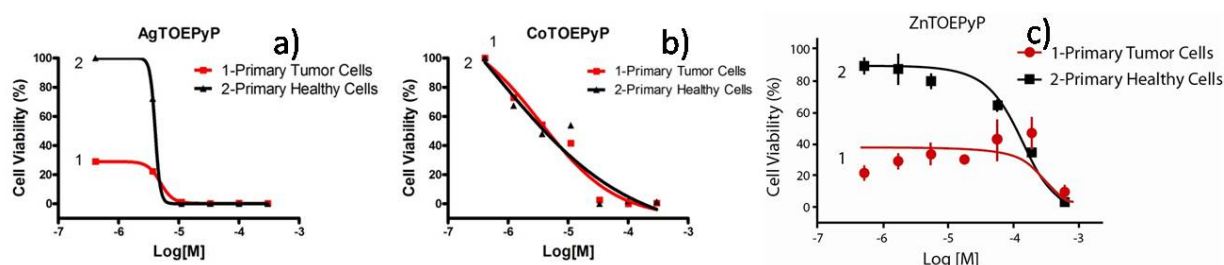


Рис. 8. Выживаемость здоровых и раковых эукариотических клеток в зависимости от концентрации AgTOEPyP (a), CoTOEPyP (b) и ZnTOEPyP (c) порфиринов.

Исследованные в данной работе раковые клетки отличаются от здоровых только одной мутацией V617F в одном белке JAK2, где в позиции 617 валин заменен фенилаланином. Это мутация, которая наблюдается у больных myeloproliferative diseases (MPDs): Chronic myelogenous leukemia (CML), Polycythemia vera (PV), Essential thrombocytosis (ET), Myelofibrosis (MF). Белок JAK2 является одним из трех компонентов в JAK-STAT сигнальном каскаде, в котором сигнал переводится через мембрану в ядро к генетическим промоторам ДНК. Обычно функцию инициирования JAK-STAT сигнального каскада осуществляют цитокинезы.

Основываясь на знании детальных отличий в структуре мутированного белка в раковых клетках от здоровых, можно предложить следующую интерпретацию полученных нами результатов по цитотоксичности и двухфотонной микроскопии взаимодействия порфиринов с клетками. Скорее всего, выраженная селективная цитотоксичность AgТOEPyP к раковым клеткам по сравнению со здоровыми, является следствием взаимодействия этого порфирина с мутированным белком. А селективная цитотоксичность ZnТOEPyP, который локализуется в одном месте на мембране клетки обусловлена его взаимодействием с активирующим центром транс-мембранного белка, с последующей инициацией сигнального каскада без участия цитокинез.

ВЫВОДЫ

1. В присутствии низких стехиометрических концентраций ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} происходит избирательная дестабилизация GC-пар ДНК, сопровождающаяся образованием внутримолекулярных агрегатов в GC-богатых областях ДНК.
2. При плавлении комплекса ДНК с ионами Ni^{2+} сначала плавится основная фракция ДНК, а затем разрушаются внутримолекулярные агрегаты в более термостабильных GC-богатых областях.
3. Связывание с ионами Cu^{2+} приводит к инверсии термостабильностей AT и GC-пар, в результате чего GC-пары плавятся раньше, чем AT-пары. При плавлении комплекса ДНК с ионами Cu^{2+} сначала разрушаются агрегаты в ставших менее стабильными GC-богатых областях, а затем плавится основная фракция ДНК.
4. При низких концентрациях cis-DDP воздействие УФ-облучения на ДНК уменьшается. Частичное поглощение УФ-энергии cis-DDP не только уменьшает прямой эффект УФ-облучения ДНК, но и уменьшает количество образованного вследствие УФ-облучения синглетного кислорода. А уменьшение синглетного кислорода уменьшает образование разрывов в ДНК из-за УФ-облучения.
5. При высоких концентрациях cis-DDP, когда существенная часть ДНК находится в A-форме, образование дефектов в ДНК при УФ-облучении облегчается (энтальпия плавления уменьшается).

6. Методом двухфотонной микроскопии впервые получены прямые доказательства взаимодействия порфиринов с клетками. Установлено, что AgТОЕРуР порфирины проникают в клетку и локализуются в нескольких специфических местах; СоТОЕРуР порфирины локализуются в нескольких областях на поверхности мембраны, не проникая внутрь клетки; а ZnТОЕРуР порфирины локализуются избирательно в одном месте на мембране клетки.
7. Показано, что AgТОЕРуР и ZnТОЕРуР селективно цитотоксичны по отношению к раковым клеткам (причем AgТОЕРуР имеет наибольший цитотоксический эффект), а СоТОЕРуР не селективен.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Л.С.Абгарян, В.И.Варданян, С.Г. Арутюнян, Е.Б. Далян. Особенности взаимодействия ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} с ДНК. “XIII Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул” Абстракт Б-62, с.182. (Санкт-Петербург 2006).
2. Y.B.Dalyan, L.S.Abgaryan, G.S. Sarkisyan, S.G, Haroutiunian, “Comparative Analysis of the Effects of Cu^{2+} and Ni^{2+} Ions on the Thermostability of DNA”, *Electronic Journal of Natural Sciences, Biophysics, of National Academy of Sciences of RA*, 2008, 2(11), pp. 7-10.
3. Lusine Abgaryan, “The Effect of UV radiation on DNA-cis-DDP Complex” –JBSD,16-th Conversation, Albany-2009,- *J. Biomol. Structure and Dynamics*, 2009, V. 26, Number 6, p 902.
4. Abgaryan L.S., Sarkisyan G.S, Dalyan Y.B. Influence of metal containing porphyrins on cellular proliferation.*International Conference “Biotechnology and health”-3 & DAAD Alumni seminar, Yerevan, Armenia, October 15-17, 2009, Book of abstracts, p. 107.*
5. Lusine Abgaryan, “Cooperative effects of cis-DDP and UV radiation on DNA helix-coil transition: *Вестник МАНЭБ*, 2010, т.15, no.5, вып.1, p. 102-106.
6. L.S.Abgaryan, G.S.Sarkisyan, Y.B.Dalyan, “Imaging of Mammalian Cells - AgТОЕРуР4 Complexes with Two Photon Microscopy” *Вестник МАНЭБ*, 2010, т.15, no.5, вып.1, p. 106-109.
7. L.S.Abgaryan, G.S.Sarkisyan, Y. Dalyan, S.G, Haroutiunian “Intercellular Effects of Metal Containing ТОЕРуРs: Cytotoxicity to Two Photon Imaging” *An International Symposium on Solvation and Ionic Effects in Biomolecules: Theory to Experiment. Tsakhkadzor, 2010, Book of Abstracts p. 48.*
8. Abgaryan L.S., Dalyan Y.B., Intercellular Effects of Metal Containing meso-tetra-(4N-oxyethylpyridyl) porphyrins: Cytotoxicity to Two Photon Imaging. *Հայաստանի կենսաբանական հանդես*, 2012, 3(64), էջ 109-113.

Արգարյան Լուսինե Սարգսի

**ԴՆԹ-ի հետ մետաղ պարունակող լիզանդների փոխազդեցությունը
երկվալենտ իոնների,
պլատինային կոմպլեքսների և պորֆիրինների օրինակով**

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. ԴՆԹ, մուտացված բջիջներ, Cu^{2+} և Ni^{2+} իոններ, cis-DDP, պորֆիրիններ, ՈԻՄ ճառագայթում, երկֆոտոն միկրոսկոպիա:

Ներկայացվող ատենախոսության մեջ ուսումնասիրված են ԴՆԹ-ի հետ դարձելի և *nã* դարձելի կապվող մետաղ պարունակող լիզանդների փոխազդեցության մեխանիզմները: Որպես լիզանդ ընտրված են բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ օժտված միացություններ (Cu^{2+} և Ni^{2+} իոններ, Pt(II)-պարունակող cis-diaminedichloroplatinum (cis-DDP), ինչպես նաև Ag(II)-, Zn(II)- և Co(II)-պարունակող մեզո-տետրա-(4N-օքսիէթիլպիրիդիլ) պորֆիրիններ):

Միկրոկալորիմետրիկ եղանակով հետազոտված են ԴՆԹ-ի հետ անցումային շարքի Cu^{2+} և Ni^{2+} իոնների առաջացրած կոմպլեքսների փոխազդեցության թերմոդինամիկական առանձնահատկությունները:

Ուսումնասիրված է ՈԻՄ-ճառագայթման ազդեցությունը ԴՆԹ-cis-DDP կոմպլեքսի թերմոդինամիկական հատկությունների վրա: Հետազոտված է էնտալպիայի կախվածությունը cis-DDP-ի կոնցենտրացիայից ՈԻՄ-առաջացրած տարբեր տևողությունների դեպքում: ԴՆԹ-ի վրա կցակարում առաջացնող երկրորդ արտաքին գործոնի միաժամանակյա ազդեցությունը կարող է լրացուցիչ ինֆորմացիա տալ cis-DDP-ԴՆԹ կոմպլեքսի կառուցվածքի մասին:

Երկֆոտոն միկրոսկոպիայի եղանակով ուսումնասիրված է AgTOEPyP, ZnTOEPyP և CoTOEPyP պորֆիրինների թափանցելիությունը և տեղայնացումը բջիջներում, ինչպես նաև պորֆիրինների ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը բնական և մուտացված բջիջների վրա: Աշխատանքի շրջանակում ստեղծվել է նոր բջջաշարք, որը պարունակում է JAK2 սպիտակուցը V617F մուտացիայով:

Ստորև բերված են ատենախոսությունում ստացված հիմնական արդյունքներն ու եզրահանգումները:

- Cu^{2+} և Ni^{2+} իոնների փոքր ստեխիոմետրիկ կոնցենտրացիաների առակայությամբ տեղի է ունենում Fe^{2+} -ի GC-հիմնային զույգի ընտրողական ապակայունացում, որն ուղեկցվում է Fe^{2+} -ի GC հարուստ տեղամասերում ներմուկեկուլային ագրեգատների առաջացմամբ:

- Fe^{2+} - Ni^{2+} կոմպլեքսի հալման ժամանակ նախ հալվում է Fe^{2+} -ի հիմնական ֆրակցիան, ապա քանդվում են ավելի ջերմակայուն GC տեղամասերում առաջացած ագրեգատները:

- Fe^{2+} -ի հետ Cu^{2+} իոնների փոխազդեցությունը հանգեցնում է AT և GC հիմնային զույգերի ջերմակայունության ինվերսիայի, որի հետևանքով GC-հիմնային զույգերը հալվում են ավելի շուտ, քան AT-հիմնային զույգերը: Fe^{2+} - Cu^{2+} կոմպլեքսի հալման ժամանակ նախ քանդվում են ագրեգատները, որոնք առաջացել են արդեն իսկ ապակայունացած GC-հարուստ տեղամասերում, ապա միայն հալվում է Fe^{2+} -ի հիմնական տեղամասը:

- Cis-DDP-ի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում, Fe^{2+} -ի վրա ՌԻՄ ճառագայթման ազդեցությունը նվազում է: Cis-DDP-ի կողմից ՌԻՄ ճառագայթման էներգիայի մասնակի կլանումը ոչ միայն նվազեցնում է Fe^{2+} -ի վրա ՌԻՄ-ճառագայթման անմիջական էֆֆեկտը, այլ նաև նվազեցնում է ՌԻՄ-ճառագայթման արդյունքում առաջացած սինգլետ թթվածնի քանակը:

- Cis-DDP-ի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում, երբ Fe^{2+} -ի զգալի մասը գտնվում է A-կոնֆորմացիայում, ՌԻՄ-ճառագայթման հետևանքով Fe^{2+} -ում դեֆեկտներ առաջանալը հեշտանում է, որն էլ հանգեցնում է հալման էնտալպիայի նվազմանը:

- Առաջին անգամ երկֆոտոն միկրոսկոպիայի մեթոդով ստացվել է անմիջական ապացույց այն բանի, որ պորֆիրինները փոխազդում են բջիջների հետ: Ցույց է տրվել, որ, AgTOEPyP պորֆիրինը թափանցում է բջջի ներս և տեղայնացվում են մի քանի որոշակի տեղամասերում; CoTOEPyP պորֆիրինը տեղայնացվում են մի քանի որոշակի տեղամասերում բջջի մեմբրանայի մակերևույթի վրա; իսկ ZnTOEPyP պորֆիրինները ընտրողականորեն տեղայնացվում են բջջի մակերևույթի վրա՝ մեկ հստակ տեղամասում:

- Ցույց է տրված, որ AgTOEPyP և ZnTOEPyP պորֆիրինները ընտրողաբար ցիտոտոքսիկ են ուռուցքային բջջիջների նկատմամբ: Ընդ որում AgTOEPyP պորֆիրինը ցուցաբերում է ամենաուժեղ ցիտոտոքսիկ հատկությունը, իսկ CoTOEPyP պորֆիրինը առհասարակ ընտրողականություն չունի:

Abgaryan Lusine Sargis

Interaction of DNA with Metal Containing Ligands: Such as Bivalent Ions, Platinum Complexes and Porphyrins

SUMMARY

Keywords: DNA, Mutated Cells, Cu^{2+} and Ni^{2+} ions, cis-DDP, porphyrins, UV Radiation, two photon microscopy.

The mechanisms of interaction of DNA with reversibly and irreversibly binding metal containing ligands are presented in the dissertation. Compounds that express high biological activity are chosen as ligands (Cu^{2+} and Ni^{2+} ions, Pt(II)-containing cis-diaminedichloroplatinum (cis-DDP), as well as Ag(II)-Zn(II)- and Co(II)-containing meso-tetra-(4N-oxyethylpyridyl) porphyrins).

Using microcalorimetric method, specificities of complexes formed as a result of interaction of DNA with transition metal ions Cu^{2+} and Ni^{2+} was investigated.

Effect of UV radiation on thermodynamic properties of cis-DDP-DNA complex was investigated. In this work, the dependence of DNA disassociation enthalpy on cis-DDP concentration for different UV radiation exposure times was studied. Simultaneous effect of additional DNA lesion inducing external agent may give us additional information regarding DNA-cis-DDP complexes.

Below are listed the main results and the conclusions of presented dissertation:

- In the presence of low stoichiometric concentrations of Cu^{2+} and Ni^{2+} ions selective destabilization of DNA GC-rich regions takes place, followed by appearance of intra-molecular aggregations in GC-rich regions of DNA.
- During DNA- Ni^{2+} complex denaturation, initially the main fraction of DNA is being dissociated followed by the melting of the intra-molecular aggregates in GC-rich regions of DNA.
- Interaction of DNA with Cu^{2+} ions results in thermostability inversion of AT and GC base pairs. As a result GC base begin to melt prior to AT base pairs. In case of DNA- Cu^{2+} complexes, initially during melting process intra-molecular aggregates in destabilized GC-rich regions are dissociated folioed by the main fraction of DNA.

- In the presence of small concentrations of cis-DDP, the effect of UV radiation on DNA is decreasing. Partial absorption of UV radiation energy by cis-DDP not only decreases the effect of UV radiation on DNA, but also decreases the amount of singlet oxygen induced by UV radiation.

- In the presence of high concentrations of cis-DDP the DNA is largely in the A-form, which makes introduction of UV induced DNA photo-damage easier. This leads to decreasing of denaturation enthalpy.

- In this work, method of two photon microscopy is used for the first time, which helped to directly show, that porphyrins are interacting with cells. Furthermore, it was shown that AgTOEPyP penetrates into the cells and localizes in particular organelles inside the cell; CoTOEPyP porphyrin is localizing in particular sites on cell membrane; and ZnTOEPyP porphyrin aggregates in one area in the cell membrane.

- It was shown that AgTOEPyP and ZnTOEPyP porphyrins are selectively cytotoxic for tumor cells. Furthermore, AgTOEPyP porphyrin has the most cytotoxic effect, and CoTOEPyP exhibits no selectivity.