



УДК 547.539 + 546.562

МЕДЬКАТАЛИЗИРУЕМОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК АРЕНАМИ**© 2003 г. О. А. Коваль*[#], Е. Г. Богуславский**[#], С. Б. Олейникова*, Е. Л. Черноловская*, В. В. Литвак*, В. А. Надолинный**[#], В. В. Власов*****Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8;****Новосибирский институт неорганической химии СО РАН, Новосибирск*

Поступила в редакцию 10.07.2002 г. Принята к печати 11.12.2002 г.

Обнаружено, что ДНК расщепляется в нейтральных растворах, содержащих арены и соли двухвалентной меди. Эффективность реакции сравнима с эффективностью расщепления ДНК такими системами, как Cu(II)–фенантролин и Cu(II)–аскорбиновая кислота, однако в отличие от них система Cu²⁺–арен не требует присутствия внешнего восстанавливающего агента или перекиси водорода. В анаэробных условиях система Cu²⁺–арен не расщепляет ДНК. Каталаза, азид натрия, а также батокупроин, специфический хелатор Cu(I), полностью ингибируют реакцию. Полученные данные позволяют предположить, что в реакции расщепления участвуют ионы Cu(I), супероксид-радикал и синглетный кислород. Методом ЭПР с применением спиновых ловушек показано, что в ходе реакции образуются алкоксильные радикалы, способные вносить разрывы в молекулы ДНК. Для эффективного протекания реакции расщепления ДНК в системе Cu(II)–*o*-бромбензойная кислота необходимо, чтобы генерация радикалов происходила в условиях образования специфического комплекса меди с ДНК и *o*-бромбензойной кислотой, в котором ионы меди наиболее вероятно координированы кислородными атомами фосфатных групп молекулы ДНК.

Ключевые слова: ионы Cu(II), кислородные радикалы, расщепление ДНК, ЭПР.

ВВЕДЕНИЕ

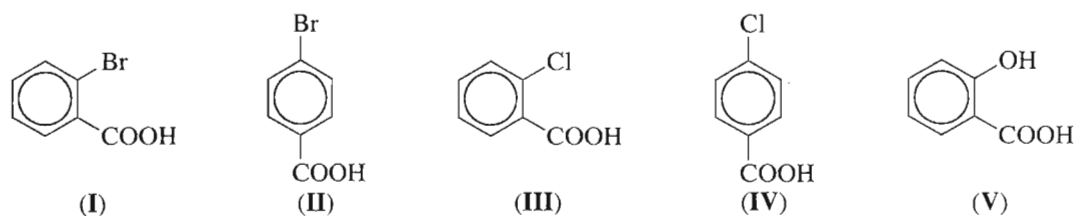
Окислительное повреждение ДНК под действием кислородных радикалов играет важную роль во многих биологически значимых процессах: мутагенезе, канцерогенезе, воспалительных реакциях, а также при химиотерапии онкологических заболеваний [1–3]. Эти процессы происходят с участием ионов переходных металлов, таких, как медь и железо, присутствующих в клетках и способных в аэробных условиях катализировать процессы образования радикалов за счет перехода Cu(II) в Cu(I) и Fe(III) в Fe(II) [4, 5]. Известен ряд металлсодержащих соединений, таких, как комплексы блеомицин–железо, фенантролин–медь или аскорбиновая кислота–медь, способных вызывать окислительное повреждение ДНК [6–8]. Однако использованию этих реагентов в качестве терапевтических препаратов препятствует ряд их недостатков. Большинство из них способны расщеплять ДНК только в присутствии внешнего восстанавливающего агента или перекиси водорода, а в физиологических условиях такие реакции протекают с невысокой эффективностью [9–12]. Поэтому создание новых металлсодержащих систем, способных эффективно расщеплять ДНК в мягких условиях, остается актуальной задачей.

В данной работе мы исследовали металлокомплексы на основе аренов, способные расщеплять ДНК в отсутствие внешнего окислителя или восстановителя. Арены – это простые низкомолекулярные вещества, свойства которых легко варьировать посредством химической модификации их структуры. Для характеристики кислородных радикалов, образующихся при реакции расщепления ДНК системой Cu(II)–арен в присутствии молекулярного кислорода, и для определения структуры медных комплексов в работе был использован метод ЭПР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы исследовали расщепление ДНК комплексами арен–Cu²⁺ при нейтральных значениях pH (50 мМ имидазольный буфер, pH 7.0), используя в качестве мишени плазмиду pMDRCAT5. ДНК инкубировали в присутствии одной из арилкарбоновых кислот [*o*-бромбензойной (I), *n*-бромбензойной (II), *o*-хлорбензойной (III), *n*-хлорбензойной (IV) или салициловой (V)] и/или CuSO₄ при 37°C в течение 1–6 ч. Продукты расщепления анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле. Типичная фотография окрашенного бромистым этидием агарозного геля после разделения продуктов расщепления плазмидной ДНК комплексами арен–медь(II) приведена на рис. 1. Исходный препарат плазмиды содержал суперспирализованную, релаксированную и линейную формы ДНК (рис. 1,

[#] Автор для переписки (тел.: (3832) 33-37-61; факс: (3832) 33-36-77; эл. почта: o.koval@niboch.nsc).



дорожка 1). Расщепление ДНК вызывает переход суперспирализованной формы плазмиды в релаксированную и затем в линейную форму (полосы II и III на рис. 1). Как видно из приведенных данных, все исследованные соединения (I)–(V) расщепляют ДНК в присутствии ионов Cu(II) в концентрации 10 мкМ. Расщепление ДНК наблюдается при одновременном присутствии в реакционной смеси арена и ионов Cu(II) . Инкубация ДНК только с одним из компонентов системы (ионами Cu^{2+} или аренами) не приводит к ее расщеплению (рис. 1, дорожка 12 и дорожки 7–11 для солей меди и соединений (I)–(V) соответственно). Незначительная деградация ДНК наблюдается без добавления солей меди при концентрации соединений (I)–(V) 10 мМ (данные не приводятся). Скорее всего, это связано с присутствием следовых количеств ионов меди в препаратах ДНК, так как прибавление в реакционную смесь EDTA до концентрации 1 мМ полностью прекращает расщепление плазмиды. При увеличении концентрации соединения (I) до 100 мкМ происходит увеличение степени расщепления ДНК (рис. 2). Дальнейшее увеличение (выше 100 мкМ) концентрации арена не приводит к увеличению степени расщепления ДНК. В оптимальных условиях (100 мкМ арена, 100 мкМ CuSO_4 , 37°C, 5 ч) эффективность расщепления мало изменяется при переходе от *o*- к *n*-изомерам и при замене атома брома на атом хлора, т.е. от

соединения (I) к соединению (V), и составляет 100% для соединений (I)–(IV) и 85% для соединения (V). Сравнение воздействия на ДНК других аренов – фенола, бензойной кислоты, бромбензола и ацетата натрия – показало [13], что только бензойная кислота расщепляет ДНК с той же эффективностью, как соединения (I)–(V). Из этих данных следует, что для эффективного расщепления ДНК необходимыми элементами структуры арена являются ароматическое кольцо и карбоксильная группа.

Известно, что расщепление ДНК под действием таких металлосодержащих реагентов, как Cu -фенантролин, Fe -EDTA или Cu -аскорбиновая кислота, происходит путем окислительной деструкции радикалами $\cdot\text{OH}$, перекисными радикалами или синглетным кислородом, образующимися в реакционной смеси [14]. Однако для эффективного действия всех перечисленных реагентов необходимо присутствие в среде восстановителя или перекиси водорода. Наши результаты показывают, что при расщеплении ДНК под действием комплексов арена–медь не требуется присутствия в среде внешнего окислителя.

Для определения механизма расщепления ДНК системой Cu(II) –арен мы исследовали роль растворенного кислорода в этом процессе. Оказалось, что проведение реакции в анаэробных условиях

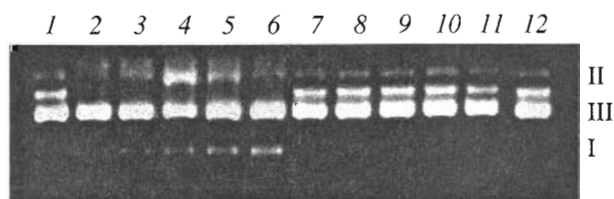


Рис. 1. Анализ продуктов расщепления ДНК плазмиды рMDRCAT5 соединениями (I)–(V) с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Фотография в проходящем УФ-свете геля, окрашенного бромистым этидием. Плазмидную ДНК инкубировали в стандартных условиях (50 мМ имидазольный буфер, 5% DMF, pH 7.0, 1 ч, 37°C) с соединениями (I)–(V) (10 мкМ) в присутствии 10 мкМ CuSO_4 (дорожки 2–6) или в отсутствие CuSO_4 (дорожки 7–11) соответственно. Дорожка 1 – исходная ДНК, дорожка 12 – ДНК, инкубированная без реагента в присутствии CuSO_4 . Цифрами сбоку показаны положения на геле суперспирализованной (I), релаксированной (II) и линейной (III) форм плазмиды.

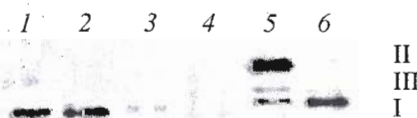


Рис. 2. Влияние концентрации *o*-бромбензойной кислоты на эффективность расщепления плазмидной ДНК в присутствии солей меди. ДНК инкубировали в течение 4 ч при 37°C в 50 мМ имидазольном буфере, pH 7.0, в присутствии 5% DMF, 100 мкМ CuSO_4 и *o*-бромбензойной кислоты, взятой в концентрациях 0, 1, 0.1, 0.01, 0.001 мМ для дорожек 2–6 соответственно. Дорожка 1 – исходная ДНК. Цифрами сбоку показаны положения на геле суперспирализованной (I), релаксированной (II) и линейной (III) форм плазмиды.

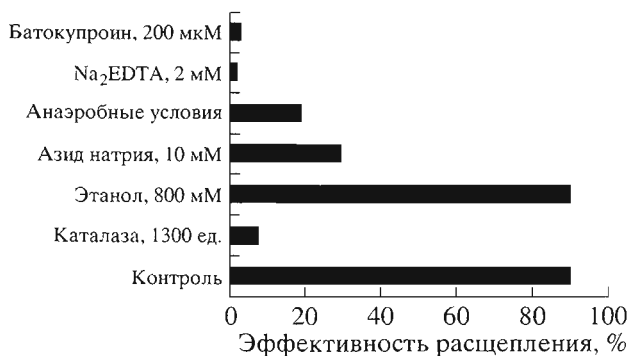


Рис. 3. Влияние ловушек кислородных радикалов и батокупроина на степень расщепления плазмидной ДНК в системе Cu–*o*-бромбензойная кислота. Реакцию расщепления проводили в течение 3 ч при 37°C в стандартных условиях. Все реакционные смеси, кроме контрольной, содержали плазмидную ДНК, буфер, 100 мкМ CuSO₄, 100 мкМ *o*-бромбензойную кислоту и один из компонентов, указанных на гистограмме. В контрольной смеси ДНК инкубировали в присутствии 100 мкМ CuSO₄ и 100 мкМ *o*-бромбензойной кислоты. Эффективность расщепления оценивали по переходу суперспирализованной формы плазмиды pMDRCAT5 в релаксированную и линейную формы, а также в ДНК-фрагменты. Для достижения анаэробных условий все компоненты реакционной смеси продували аргоном в течение 20 мин.

практически полностью ингибирует расщепление ДНК (рис. 3). По аналогии с реакциями других медьсодержащих комплексов, можно предположить, что кислород участвует в генерировании активных частиц, таких, как $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 или $\text{O}_2^{\cdot-}$, которые инициируют процесс окислительного разрушения ДНК. В присутствии внешнего восстановителя (например, β -меркаптоэтанола) ионы меди, находящиеся в комплексе с реагентом, переходят из состояния Cu(II) в состояние Cu(I). Именно ионы Cu(I) способны реагировать с молекулярным кислородом или перекисью водорода с образованием высокоактивных кислородных радикалов, повреждающих ДНК. Известно, что в окислительно-восстановительных процессах ионы меди могут катализировать образование гидроксильных радикалов по циклической реакции Габера–Вейса [15]:

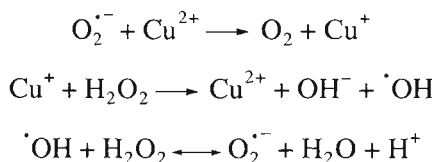


Схема 1.

Альтернативный механизм генерации ДНК-повреждающих радикалов для описанных в литературе комплексов *N,N'*-бис(салицилиден)этилендиамина с медью (салиен-комплексы), индуцирующих переход Cu(II) в Cu(III), сопровождается образо-

ванием кислородных радикалов за счет внутри-молекулярного окисления-восстановления [5].

Для выяснения природы радикалов, образующихся при расщеплении ДНК в системе Cu(II)–*o*-бромбензойная кислота, мы проводили реакцию расщепления в присутствии различных ловушек кислородных радикалов – этанола, азид натрия и каталазы, а также в присутствии батокупроина – специфического хелатора Cu(I) (рис. 3). Однако следует принять во внимание, что согласно литературным данным, ингибирование расщепления ДНК в присутствии азид натрия в некоторых случаях может происходить вследствие высокой ионной силы раствора, а не сродства NaN₃ к синглетному кислороду [16]. Было найдено, что батокупроин полностью ингибирует расщепление ДНК. Из данных, приведенных на рис. 3, видно, что и азид натрия, являющийся ловушкой синглетного кислорода, и каталаза – ловушка перекисных радикалов – препятствуют расщеплению ДНК, тогда как этанол – ловушка гидроксильных радикалов – не влияет на ход реакции расщепления. Эти результаты позволяют предположить, что в процессе расщепления ДНК системой Cu(II)–*o*-бромбензойная кислота существенную роль играют ионы Cu(I) и радикалы перекисного происхождения, а не $\cdot\text{OH}$ -радикалы.

Для идентификации кислородных радикалов, образующихся в процессе реакции мы использовали метод ЭПР с применением спиновых ловушек. Известно, что молекулы α -фенил-*N*-трет-бутилнитрона (PBN) вступают в реакцию с короткоживущими радикалами с образованием долгоживущих нитроксильных радикалов [17]. У таких радикалов в β -положении к нитроксильной группе находится атом водорода, а исходный короткоживущий радикал, послуживший причиной возникновения нитроксильного радикала, оказывается присоединенным к тому же атому углерода (схема 2).

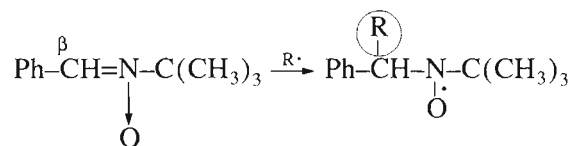


Схема 2.

Таким образом, короткоживущий радикал включается в состав долгоживущего радикала, что отражается на расщеплении линий в спектрах ЭПР. Наличие атомов с ненулевыми ядерными магнитными моментами обычно проявляется в дополнительном расщеплении линий спектров. По величине сверхтонких расщеплений на ядре атома азота и β -протоне можно судить о радикале-предшественнике.

Мы попытались обнаружить активные короткоживущие радикалы, образующиеся в условиях

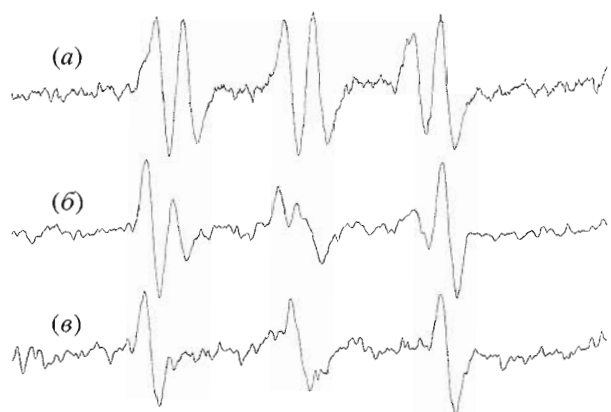


Рис. 4. Спектры ЭПР продуктов взаимодействия активных интермедиатов с ловушкой радикалов (PBN). Образцы содержали 200 мМ PBN, 1 мМ CuSO_4 , 1 мМ *o*-бромбензойную кислоту, 40 мкг ДНК плазмиды pMDCAR5. (а) – время инкубации 24 ч, спектр формы А; (б) – время инкубации 48 ч, суперпозиция двух спектров; (в) – время инкубации 72 ч, спектр формы Б.

расщепления плазмидной ДНК и выяснить влияние каждого из компонентов реакции на скорость образования таких радикалов. К раствору спиновой ловушки (PBN) прибавляли в разной комбинации компоненты реакционной смеси (ДНК, *o*-бромбензойную кислоту, CuSO_4 и/или EDTA). Для получения четких сигналов исследование проводили при высоких концентрациях всех реагирующих частиц (100 мкМ ДНК, 1 мМ *o*-бромбензойная кислота, 1 мМ CuSO_4 , 4 мМ EDTA). С целью построения кинетических кривых накопления радикалов образцы выдерживали при 40°C в течение 120 ч, периодически регистрируя спектры ЭПР. Данные экспериментов показали, что в процессе реакции происходит образование нитроксильных радикалов двух типов (рис. 4). Первый из них (рис. 4а, форма спектра А) характеризуется константами сверхтонкой структуры (СТС) (тензорами сверхтонкого взаимодействия) a_N 16.0 и a_H 3.4 Гс, а спектр Б второго типа радикалов (рис. 4в) состоит только из триплета линий a_N 17.5 Гс без расщепления на β -протоне (где a_N и a_H константы сверхтонкого взаимодействия, относящиеся к атому азота и β -атому водорода ловушки соответственно). Ширина линии в спектрах обеих форм одинакова и составляет 1.7 Гс. Форма Б обычно регистрируется несколько позже формы А.

Полученные параметры спектров ЭПР более всего соответствуют литературным данным для ловушек типа PBN, когда радикалом-предшественником является короткоживущий алкоксильный радикал [18]. Однако предположение об участии алкоксильных радикалов в реакции не объясняет дальнейшего превращения радикалов, при котором происходит удаление атома водорода от β -углеродного атома ловушки. Можно предполо-

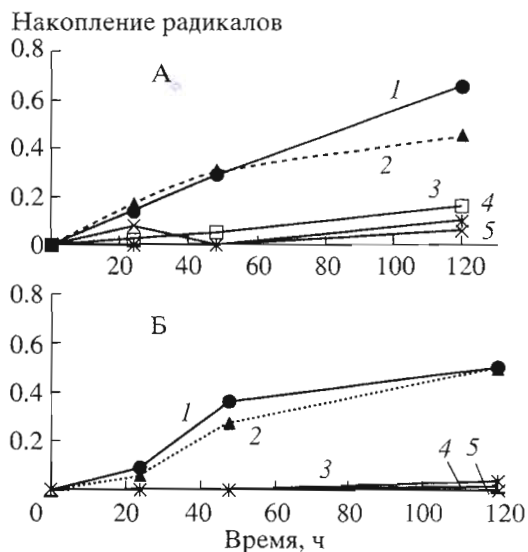


Рис. 5. Кинетика накопления радикалов первого (А) и второго (Б) типов в присутствии CuSO_4 и *o*-бромбензойной кислоты. Зависимости: 1 – ДНК, инкубированная в присутствии 1 мМ CuSO_4 и 1 мМ *o*-бромбензойной кислоты, 2 – *o*-бромбензойная кислота (1 мМ), инкубированная в присутствии 1 мМ CuSO_4 , 3 – ДНК, инкубированная в присутствии 1 мМ CuSO_4 , 4 – ДНК, инкубированная в присутствии 1 мМ *o*-бромбензойной кислоты, 5 – *o*-бромбензойная кислота (1 мМ), инкубированная в присутствии 1 мМ CuSO_4 и 2 мМ EDTA.

жить, что на первой стадии образуется более сложный комплекс с PBN, включающий ион меди, и перекисный фрагмент, который затем участвует в реакции внутримолекулярного окисления. При анализе кинетик накопления радикалов первого и второго типов, приведенных на рис. 5, видно, что в отсутствие одного из компонентов системы – либо меди, либо *o*-бромбензойной кислоты – не происходит накопления радикалов как первого, так и второго типов. Радикалы первого и второго типов образуются с одинаковой скоростью в системе Cu(II) –*o*-бромбензойная кислота в присутствии и в отсутствие ДНК. Прибавление в систему EDTA ингибирует накопление радикалов второго типа. Сопоставление этих данных с результатами расщепления плазмидной ДНК позволяет заключить, что в повреждении ДНК, скорее всего, участвуют радикалы типа Б. Учитывая то, что генерирование радикалов обоих типов не зависит от наличия в системе ДНК, можно предположить, что в растворе происходит формирование специфических комплексов меди с *o*-бромбензойной кислотой, которые катализируют образование кислородных радикалов.

Для выяснения состава комплексов мы исследовали влияние порядка прибавления компонентов смеси на скорость реакции расщепления (рис. 6). *o*-Бромбензойную кислоту, CuSO_4 и ДНК попар-

но предынкубировали в стандартных условиях в течение 20 мин, а затем прибавляли третий компонент смеси и проводили реакцию. Оказалось, что при предынкубации меди с *o*-бромбензойной кислотой степень расщепления ДНК ниже, чем в случае предынкубации меди с ДНК или *o*-бромбензойной кислоты с ДНК. Можно предположить, что в процессе инкубации ионов меди с *o*-бромбензойной кислотой образуется *o*-бромбензоат меди, не способный вызывать эффективное расщепление ДНК, за счет препятствования образованию комплексов меди с ДНК. Хотя для генерации радикалов обоих типов важно лишь образование комплекса медь-*o*-бромбензойная кислота, все же возможно, что для эффективного расщепления ДНК необходимо образование первичных комплексов ДНК-Cu и затем ДНК-Cu-*o*-бромбензойная кислота. В этом случае генерация реакционноспособных кислородных частиц происходит в непосредственной близости к ДНК, что и приводит к специфическому и эффективному расщеплению.

Известно, что в нуклеиновых кислотах эндциклические атомы азота и атомы кислорода фосфатных групп являются хорошими лигандами для ионов переходных металлов [19]. Мы изучали специфические комплексы меди с ДНК, образующиеся в процессе реакции, с помощью метода ЭПР. Были записаны спектры ЭПР серии растворов гуанина (G), дезоксигуанозина (dG) и гуанозин-5'-монофосфата (GMP) в присутствии CuSO₄ при мольном соотношении Cu²⁺-гетероциклическое основание в диапазоне от 0.5 до 10. Из-за низкой растворимости гуанина при нейтральных значениях pH в растворы, содержащие гуанин, дополнительно вводили NaOH (pH 13), что приводило к осаждению меди при низких соотношениях Cu²⁺-гуанин. Прибавление азотистого основания приводило к появлению в спектрах ЭПР новых линий, отсутствовавших в спектре CuSO₄. Изменение соотношения Cu²⁺-гетероциклическое основание приводило к увеличению интенсивности этих линий, но не изменяло их положения. Напротив, интенсивность линий исходной формы Cu²⁺ уменьшалась и совершенно исчезала при высоких концентрациях dG или GMP. Такое поведение сигнала соответствовало появлению в смеси новой формы меди. Согласно данным ЭПР, регистрируемые новые формы меди индивидуальны, хотя и несколько различаются между собой. Полученные спектры типичны для мономерных комплексов ионов меди(II), а их параметры приведены в таблице. Расшифровка спектров ЭПР подтверждена моделированием по программе SimFonia (Bruker) (таблица).

Ионы двухвалентной меди в исходном растворе находятся в виде комплексов с водой состава Cu(H₂O)₆²⁺. Ближайшее окружение иона имеет

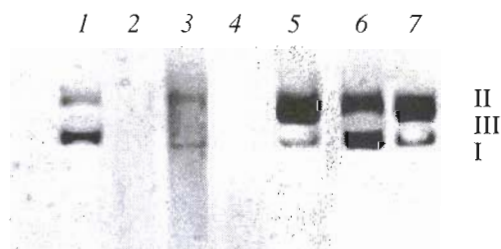


Рис. 6. Влияние порядка прибавления реагентов на степень расщепления ДНК в системе Cu-*o*-бромбензойная кислота. Реакцию расщепления проводили в течение 5 ч при 37°C в стандартных условиях. Реакционная смесь содержала ДНК (40 нг/мкл), 100 мкМ CuSO₄ и *o*-бромбензойную кислоту в концентрации 100 мкМ (дорожки 2–4) и в концентрации 10 мкМ (дорожки 5–7). Дорожки 2 и 5 – ДНК была предынкубирована с соединением (I), дорожки 3 и 6 – предынкубация CuSO₄ с соединением (I), дорожки 4 и 7 – ДНК предынкубировали с CuSO₄. Время предынкубации 20 мин. Цифрами сбоку показаны положения на геле суперспирализованной (I), релаксированной (II) и линейной (III) форм плазмиды.

симметрию вытянутого октаэдра, в котором четыре атома кислорода расположены в одной плоскости на меньшем расстоянии от центрального атома, чем два других. Эти четыре ближкорасположенных экваториальных атома образуют более прочные связи с центральным ионом, чем два остальных. Орбиталь неспаренного электрона находится в плоскости этих четырех ближайших атомов, в связи с чем параметры спектров ЭПР особенно чувствительны к замещению атомов в экваториальной плоскости. Чувствительность спектров к замещению и даже удалению других атомов проявляется в меньшей степени. Замещение экваториального лиганда на другой, образующий более прочную ковалентную связь, сопровождается уменьшением компоненты g_z и увеличением расщепления A_z . При ступенчатом замещении атомов одного вида на атомы другого вида, значения g_z и A_z обычно меняются аддитивно. Если же, как в нашем случае, происходит замещение атомов кислорода, не имеющих магнитных ядер, на атомы азота, обладающие магнитным моментом, то это приводит к дополнительному расщеплению

Параметры спектров ЭПР продуктов взаимодействия сульфата меди с остатком гуанина в составе гетероциклического основания, нуклеотида и нуклеозида

Компоненты	g_z	g_y	g_x	A_z	A_y	A_x
CuSO ₄	2.406	2.078	2.075	125		
G	2.276	2.045	2.045	185	36	30
dG	2.335	2.070	2.060	150		
GMP	2.332	2.083	2.080	155		

линий спектра. В неупорядоченных образцах с природным содержанием изотопов $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ такое взаимодействие обычно приводит к дополнительному уширению линий спектров.

В присутствии большого избытка гуанина наблюдалось расщепление линий спектра ЭПР в области перпендикулярной ориентации, и образующаяся форма была близка по параметрам спектров ЭПР к известному тетрапиридиновому комплексу, образуемому при большом избытке пиридина в растворе [20]. На основании этих данных можно предположить, что, как и в случае с тетрапиридинатом меди, в зарегистрированной форме атом меди окружен четырьмя атомами азота остатков гуанинов. В случае взаимодействия водного комплекса меди с азотистым основанием в составе dG и GMP параметры спектров ЭПР полученного продукта имеют промежуточные значения. Можно предположить, что происходит образование промежуточной формы комплекса меди с замещением только двух атомов кислорода на атомы азота. Дальнейшего замещения не наблюдается даже при 10-кратном избытке основания, что вероятно определено стерическими факторами. Молекулы dG и GMP содержат большие по объему углеводные и фосфатные группировки, что мешает замещению молекул воды в координационной сфере иона меди.

При титровании растворов сульфата меди одно- и двухцепочечными олигонуклеотидами в спектрах ЭПР наблюдалось уменьшение концентрации исходного водного комплекса, однако наблюдавшиеся продукты реакции имели значительно более широкие линии спектров ЭПР, что делало невозможным выделение линий индивидуальных форм в низкополевой области спектра. В высокополевой области происходило смещение линий спектра в сторону меньших значений g -фактора с одновременным их уширением, такое же, как и при замещении атомов кислорода на атомы азота в описанных выше экспериментах. Такие изменения объясняются одновременным образованием нескольких форм комплекса меди с разной степенью замещения и с несколько различающимися параметрами. При соотношении Cu^{2+} -олигонуклеотид равном 1 : 5 практически не наблюдается исходного комплекса меди.

В экспериментах с двухцепочечным олигонуклеотидом замещение молекул воды в координационной сфере ионов меди на атомы азота происходило в значительно меньшей степени. Хотя и наблюдалось уширение высокополевой компоненты спектра и уменьшение концентрации исходного водного комплекса в растворе, нам не удалось добиться его полного подавления даже при концентрации двухцепочечного олигонуклеотида, равной 200 мкМ. Поскольку атомы кислорода диамагнитны, замещение атомов кислорода

молекулы воды на атомы кислорода фосфатных групп молекулы ДНК не может быть определено методом ЭПР, и данные о координации ионов меди эндоциклическими атомами азота оснований ДНК не противоречат возможности координации ионов меди кислородами фосфатных групп.

В соответствии с полученными результатами генерация реакционноспособных кислородных радикалов происходит вследствие образования комплекса *o*-бромбензойной кислоты с ионами меди, связанными с ДНК. В том случае, если в этом процессе участвуют ионы $\text{Cu}(\text{II})$, координированные атомами азота ДНК, эффективность расщепления одноцепочечного олигонуклеотида должна быть выше эффективности расщепления дуплекса, поскольку при титровании меди олигонуклеотидом водный комплекс меди исчезает и появляются азотсодержащие формы (связанные с ДНК), чего не происходит при титровании ДНК-дуплексом. Сравнительная степень расщепления системой Cu -*o*-бромбензойной кислоты одноцепочечной ДНК и ДНК-дуплекса (данные не приводятся), мы показали, что эффективность расщепления одноцепочечного олигонуклеотида незначительно выше расщепления ДНК-дуплекса. Сопоставление данных ЭПР и данных по расщеплению ДНК позволяет предположить, что в образовании реакционноспособного комплекса наиболее вероятно участвуют ионы меди, координированные атомами кислорода фосфатных групп.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что деструкция ДНК в системе $\text{Cu}(\text{II})$ -*o*-бромбензойная кислота происходит при действии алкоксильных радикалов, продуцируемых в аэробных условиях специфическим комплексом Cu -*o*-бромбензойная кислота. При этом эффективное расщепление ДНК возможно только в том случае, если ион меди одновременно связан с молекулой ДНК и с молекулой *o*-бромбензойной кислоты. В условиях образования такого специфического комплекса генерация реакционноспособных частиц происходит в непосредственной близости к ДНК, что позволяет короткоживущим радикалам повреждать ДНК в сайте связывания иона меди.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали плазмиду рMDCAT5 [21], любезно предоставленную д-ром К. Кохно (Медицинский университет г. Оита, Япония), олигонуклеотиды dCTTCCCCCCCCTTC и dGAAGGGGGGAAG, синтезированные в группе олигонуклеотидного синтеза НИБХ СО РАН стандартным фосфитамидным методом, а также органические кислоты – *o*-бромбензойную (I), *n*-бромбензойную (II), *o*-хлорбензойную (III), *n*-хлорбензойную (IV) и салициловую (V) (Aldrich, США).

Расщепление ДНК плазмиды pMDRCAT5 в системе арен–медь. Плазмидную ДНК (40 нг/мкл) инкубировали при 37°C в присутствии одного из соединений (I)–(V) в концентрации от 1 до 100 мкМ и/или CuSO₄ в 50 мМ имидазольном буфере, pH 7.0, в присутствии 5% DMF. Время инкубации и концентрации соединений (I)–(V) и ионов меди указаны в подписях к рисункам. Реакцию останавливали прибавлением EDTA, pH 8.0, до концентрации 2 мМ и 1/10 объема буфера для нанесения (0.25% бромфеноловый голубой, 0.25% ксилен цианоловый, 80% глицерин, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.5). Полученные пробы наносили на 1% агарозный гель, содержащий бромистый этидий (1 мкг/мл) и 1 × TBE (89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 1 мМ EDTA) в качестве электрофоретического буфера. Электрофорез проводили в течение 2 ч при 120 В. По окончании электрофореза гель фотографировали в ультрафиолетовом свете с фильтром λ 254 нм на трансиллюминаторе 2011 Macrovue (ЛКВ, Швеция). Для определения степени расщепления ДНК фотопленку сканировали с помощью сканера Astra 1220S фирмы Umax, и изображение обсчитывали с помощью программы Gel-Pro Analyzer. Степень расщепления определяли как процент перехода суперспирализованной формы плазмиды в релаксированную и линейную и в ДНК-фрагменты.

При проведении реакции расщепления ДНК в присутствии ловушек кислородных радикалов в стандартную реакционную смесь объемом 20 мкл, содержащую 40 нг/мл ДНК, 50 мМ имидазольный буфер, pH 7.0, 100 мкМ соединение (I) и 100 мкМ CuSO₄, прибавляли батокупроин до концентрации 200 мкМ, EDTA до концентрации 2 мМ, азид натрия до концентрации 10 мМ, этанол до концентрации 800 мМ или каталазу до концентрации 1300 ед./мл.

Для проведения реакции в анаэробных условиях перед смешиванием все компоненты реакционной смеси продували аргоном в течение 20 мин.

Регистрация спектров ЭПР в присутствии спиновых ловушек. В качестве спиновой ловушки в экспериментах использовали α-фенил-N-тембутилнитрон (PBN). Реакционные смеси, содержащие раствор PBN, CuSO₄, соединение (I) и ДНК плазмиды pMDRCAT5 (состав реакционных смесей указан также в подписях к рис. 4, 5), помещали в стеклянные ампулы диаметром 3 мм и запаивали. Раствор заливали на высоту 50–60 мм и оставляли над раствором приблизительно такой же объем газовой фазы. Такое заполнение позволяло наблюдать различия в протекании реакции вблизи раздела фаз, где содержание кислорода в растворе может пополняться за счет диффузии из газовой фазы. Спектры ЭПР снимали на стандартном радиоспектрометре Varian E1-09, оснащенном устройством аналогово-цифрового преобразова-

ния. Оригинальное программное обеспечение позволяло проводить накопление сигнала и сохранение его в формате Win-Epr. Расшифровку спектров ЭПР подтверждали моделированием по программе SimFonia (фирмы Bruker). Исследование проводили в X-диапазоне (9 ГГц) при комнатной температуре (24°C). Спектр иона Mn²⁺ использовали в качестве бокового сигнала.

Регистрация спектров ЭПР комплексов меди в присутствии олигонуклеотидов или остатков гуанина. Для получения ДНК-дуплексов комплементарные олигонуклеотиды dCTTCCCCCCCCCTTC и dGAAGGGGGGGGAAG выдерживали при 95°C в течение 10 мин и затем медленно охлаждали. Реакционные смеси содержали 100 мкМ CuSO₄ и/или олигонуклеотид dCTTCCCCCCCCCTTC, комплементарный дуплекс или гуаниновое основание в концентрациях 50, 100, 200, 500 мкМ или 1 мМ.

Реакционные смеси переносили в кварцевые ампулы диаметром 5 мм и запаивали. Ампулы с образцами быстро охлаждали до температуры жидкого азота, после чего записывали спектры ЭПР при температуре 77 К и частоте 9 ГГц. Во избежание кристаллизации водных растворов и растрескивания ампул к образцам перед запаиванием прибавляли равный объем этанола или DMF. Для калибровки микроволновой частоты и магнитного поля использовали эталонные спектры порошка дифенилпикрилгидразила (g = 2.0036) и иона Mn²⁺, внедренного в решетку MgO (расщепление между 3 и 4 линией составляет 86.7 Гс).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят М.А. Зенкову за обсуждение результатов. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ-школы № 00-15-97969) и гранта CRDF Rec-008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oikawa S., Kawanishi S. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 4584–4590.
2. Oikawa S., Kurasaki M., Kojima Y., Kawanishi S. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 8763–8770.
3. Borah S., Melvin M.S., Lindquist N., Manderville R.A. // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 4557–4562.
4. Hadi N., Singh S., Ahmad A., Zaidi R. // Neuroscience Letters. 2001. V. 308. P. 83–86.
5. Lamour E., Routier S., Catteau J.-P., Bailly C., Vezin H. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 1862–1869.
6. Sigman D., Mazumder A., Perrin D. // Chem. Rev. 1993. V. 93. P. 2295–2316.
7. Stubbe J., Kozarich J. // Chem. Rev. 1987. V. 87. P. 1107–1136.
8. Kazakov S.A., Astashkina T.G., Mamaev S.V., Vlassov V.V. // Nature. 1988. V. 335. P. 186–188.

9. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, 1994.
10. Francois J., Saison-Behmoaras T., Chassignol M., Thuong T., Helene C. // J.B.C. 1989. V. 264. P. 5891–5898.
11. Frolova E., Fedorova O., Knorre D. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 5–12.
12. Sergeev D., Zaritova V. // Russian Chemical Revs. 1996. V. 65(4). P. 355–378.
13. Koval O.A., Chernolovskaya E.L., Litvak V.V., Vlassov V.V. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2001. V. 20 (4–7). P. 851–854.
14. Pogozelski W., Tullius T. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1089–1108.
15. Koppenol W. // Redox Rep. 2001. V. 6. P. 229–234.
16. Reed C.J., Douglas K.T. // Biochem. J. 1991. V. 275. P. 601–608.
17. Маров И.Н., Костромина Н.А. ЭПР и ЯМР в химии координационных соединений. М.: Наука, 1979.
18. Зубарев В.Е. Метод спиновых ловушек. М.: Изд-во МГУ, 1984.
19. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: Пер. с англ. М.: Мир, 1987.
20. Богуславский Е.Г., Шкляев А.А., Максимов Н.Г., Алаудинова В.М., Коломников И.С., Ануфриенко В.Ф. // Изв. АН СССР. Серия хим. 1980. № 6. С. 1231–1234.
21. Uchiyumi T., Kohno K., Tanimura H., Hidaka K., Asakuno K., Abe H., Uchida Y., Kuwano M. // FEBS Lett. 1993. V. 326. P. 11–16.

Copper-Catalyzed Cleavage of DNA by Arenes

O. A. Koval*#, E. G. Boguslavsky**, S. B. Oleinikova*, E. L. Chernolovskaya*,
V. V. Litvak*, V. A. Nadoliny**, and V. V. Vlassov*

Phone: +7 (3832) 33-3761; fax: (3832) 33-36-77; e-mail: o.koval@niboch.nsc

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. akademika Lavrent'eva 3, Novosibirsk, 630090 Russia

DNA was found to be cleaved in neutral solutions containing arenes and copper(II) salts. The reaction is comparable in efficiency with the DNA cleavage by such systems as Cu(II)–phenanthroline and Cu(II)–ascorbic acid, but, in contrast to the latter, the system Cu²⁺–arene does not require the presence of an exogenous reducing agent or hydrogen peroxide. The system Cu²⁺–arene does not cleave DNA under anaerobic conditions. Catalase, sodium azide, and bathocuproine, which is a specific chelator of Cu(I), completely inhibit the reaction. The data obtained allow one to suppose that Cu(I) ions, superoxide radical, and singlet oxygen participate in the reaction. It has been shown by the EPR method using spin traps that the reaction proceeds with formation of alkoxy radicals, which can insert breaks in the DNA molecule. For effective cleavage of DNA in the Cu(II)–*o*-bromobenzoic acid system, the radicals have to be generated by a specific copper–DNA–*o*-bromobenzoic acid complex, in which copper ions are most probably coordinated with oxygen atoms of the DNA phosphate groups. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: Cu(II) ions, oxygen radicals, DNA cleavage, EPR