

Біохімія

УДК 612.017.1

**ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ
ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ
ВЗАЄМОДІЇ ПОХІДНИХ АКРИДОНУ З ДНК**

О. Рачков*, Ю. Ушенін, Ю. Холодова*,
В. Негруцька*, Л. Пальчиковська*, О. Солдаткін***

**Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Заболотного, 150, Київ 03143, Україна
e-mail: oleksandr_rachkov@yahoo.com*

***Інститут фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України
пр. Науки, 41, Київ 03028, Україна*

Методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням спектрометра „Плазмон SPR-4m“ показана можливість дослідження взаємодій низькомолекулярних синтетичних похідних акридону з ДНК. Спектрометрія поверхневого плазмонного резонансу дає змогу відстежувати як процес іммобілізації ДНК на золотій поверхні сенсорного чипу, так і взаємодії іммобілізованої ДНК з похідними акридону в режимі реального часу. Параметри взаємодії досліджуваних похідних акридону з іммобілізованою ДНК, отримані за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу, корелюють з результатами вивчення біологічної активності досліджуваних похідних акридону в *in vitro* ферментативних системах.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, акридон, ДНК, міжмолекулярні взаємодії.

Боротьба з небезпечними хворобами була і залишається однією з найважливіших та найактуальніших проблем у всьому світі. Щоб зупинити патологічний процес, необхідні високоефективні лікарські засоби, які б селективно пригнічували розвиток патогенних вірусів, бактерій і т.п. Пошуки нових препаратів на основі як природних, так і синтетичних похідних акридону, обумовлені широким спектром біологічної активності сполук цього класу. Їм притаманні противірусна [9, 14, 16], протимікробна [7], протипухлинна [4, 6, 10] й інші терапевтичні дії. У цьому плані особливий інтерес викликають нові похідні акридон-4-карбонової кислоти [8, 15]. Тестування цих речовин у системі транскрипції *in vitro* засвідчило їхню здатність суттєво впливати на синтез РНК. Це може відбуватися завдяки взаємодіям похідних акридону з ДНК, з білками-ферментами або з обома компонентами ДНК-ферментних комплексів. Вивчення таких взаємодій сприяє як більш глибокому розумінню молекулярних механізмів дії таких речовин, так і підвищенню ефективності процесу розробки нових медичних препаратів. Одним із сучасних привабливих методичних підходів для вирішення таких завдань є спектроскопія поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Цей підхід дає змогу вивчати міжмолекулярні взаємодії різноманітних компонентів без застосування додаткової стадії їх мічення радіоактивними, флуоресцентними або будь-якими іншими мітками, та ще і в режимі реального часу [5, 11]. В Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України була розроблена ціла низка спектрометрів ППР, які одержали загальну назву „Плазмон“. Такі прилади відзначаються високою чутливістю детектування і простотою використання та зарекомендували себе дієвим засобом біосенсорних досліджень у бага-

тьох лабораторіях України і (під назвою „Biosuplar“) у деяких країнах світу [1–3, 13]. Зазвичай за допомогою спектроскопії ППР досліджувалися взаємодії макромолекул, але не виключається можливість і детекції молекул з низькою молекулярною масою [12].

Тому основною метою нашої роботи було дослідити можливість використання методу поверхневого плазмонного резонансу для оцінки рівня взаємодій між ДНК і низькомолекулярними лігандами на прикладі похідних акридону.

У роботі використовували ДНК фагміди pTz19R („Fermentas“, Литва), 6-меркапто-1-гексанол та диметилсульфоксид – „Fluka“ (США), трис та ЕДТА – „Sigma“ (США). KH_2PO_4 , NaOH , H_2O_2 , H_2SO_4 та HCl – реагенти вітчизняного виробництва, кваліфікації „хч“. Досліджувані похідні акридону – амід акридон-4-карбонової кислоти (~300 Да) синтезовано у відділі синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Спектрометр ППР „Плазмон SPR-4m“ та програмне забезпечення до нього розроблені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України.

Чутливим елементом спектрометра ППР слугував тонкий шар (50 нм) золота, який було нанесено на скляну пластинку. Безпосередньо перед дослідом золоту поверхню скляної пластинки очищували інкубацією в суміші „піранья“ (суміш 30%-ного перекису водню та концентрованої сірчаної кислоти у співвідношенні 1:3) протягом 2 хв. Після цього пластинку багаторазово промивали дистильованою та дейонізованою водою і висушували на повітрі.

Оброблену пластинку встановлювали на призму приладу, використовуючи імерсійну рідину, що має такий же показник заломлення світла, як і скло призми та пластинки. Таким чином, для поширення світла ці три елементи являють собою єдине ціле. Золота поверхня слугувала дном проточної вимірювальної комірки об'ємом приблизно 20 мкл. Кільце зі силіконової гуми утворювало її стінки. Кришка з оргскла містила в собі отвори для з'єднання з вхідною та вихідною трубками, по яких через комірку проходять буферний розчин і дослідні зразки (рис. 1). Швидкість потоку рідини (в основному 40 мкл/хв) контролювали за допомогою перистальтичного насоса.

На початку досліду вимірювальну комірку промивали робочим буферним розчином (10 мМ трис- HCl , рН 8, 1 мМ ЕДТА та 2,5% ДМСО), до отримання стабільного відгуку приладу – базової лінії. Імобілізацію ДНК проводили в 0,5 М KH_2PO_4 , рН 3,8 (розчин для іммобілізації). Спочатку вимірювальну комірку промивали розчином для іммобілізації, а потім вводили розчинену в ньому ДНК pTz19R. Для видалення надлишку ДНК, що не іммобілізувалася, використовували спочатку розчин для іммобілізації протягом 20–30 хв, а потім робочий буферний розчин.

Для запобігання контактній досліджуваних компонентів з тими ділянками поверхні золота, що лишилися незакритими іммобілізованою ДНК, сенсорну поверхню обробляли 6-меркапто-1-гексанолом (МКГ). Для цього у вимірювальну комірку вводили 5 мМ МКГ в робочому буферному розчині та промивали ним же до стабілізації сенсорного відгуку. На основному етапі досліду у вимірювальну комірку вводили розчини похідних акридону різної концентрації.

Для дослідження взаємодій похідних акридону з ДНК за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу використовували спектрометр ППР „Плазмон SPR-4m“. Це контрольований комп'ютером оптоелектронний спектрометр, у якому використовується явище ППР в оптичній конфігурації Кречмана. У плівці золота, що формує сенсорну поверхню, поляризований промінь від напівпровідникового лазерного

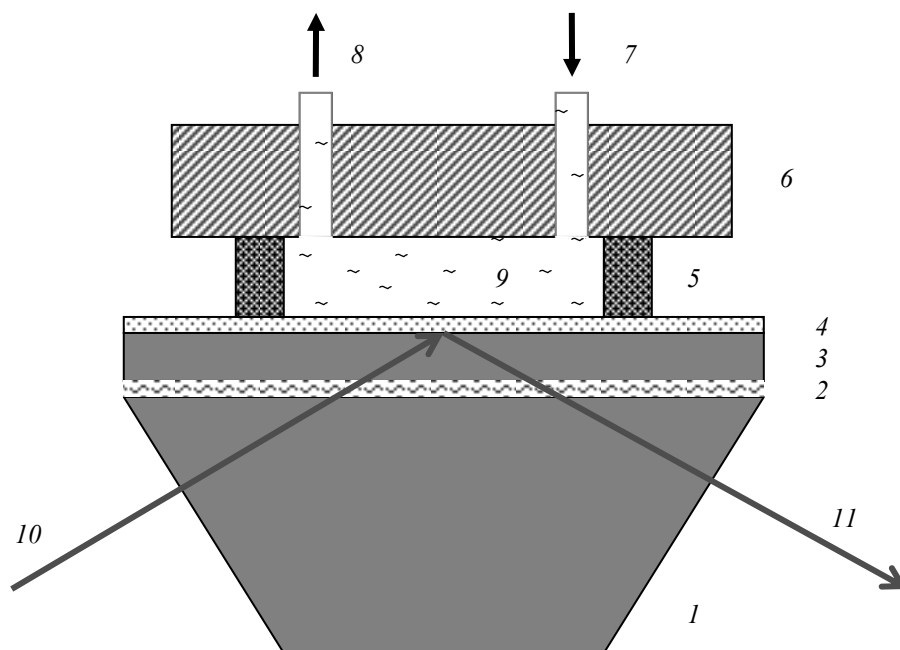


Рис. 1. Схема вимірювальної комірки у розрізі: 1 – скла́на призма ($n=1,61$); 2 – імерсія ($n=1,61$); 3 – скла́на пластинка ($n=1,61$); 4 – шар золота, нанесений на скла́ну пластинку; 5 – бокові стінки вимірювальної комірки; 6 – кришка вимірювальної комірки, що містить отвори для входу (7) та виходу (8) розчинів; 9 – внутрішній об'єм вимірювальної комірки; 10 – промінь світла, що падає на сенсорну поверхню; 11 – промінь світла, що відбивається від сенсорної поверхні.

діода ($\lambda=650$ нм) збуджує коливання електронної плазми (поверхневий плазмон). Необхідні умови для збудження плазмону створюються спеціальною призмою, яка може обертатися на контрольований комп'ютером кут.

Графік залежності положення мінімуму ППР кривої від часу називається сенсограмою (рис. 2). Якщо протягом деякого проміжку часу на робочій поверхні не відбувається жодних змін і положення мінімуму кривої ППР не змінюється, сенсограма має вигляд горизонтальної лінії (базова лінія). При зміні стану робочої поверхні має місце зсув мінімуму кривої ППР вліво чи вправо, і на сенсограмі спостерігають відхилення від базової лінії вгору чи вниз, відповідно. Ці відхилення і є сенсорним відгуком. У нашому випадку (на рис. 2 проміжок 300–310 хв) в реальному часі відображається стадія асоціації похідних акридону з іммобілізованою ДНК при надходженні до вимірювальної комірки відповідного розчину. Промивання комірки робочим буферним розчином (починаючи з 310 хв) сприяє дисоціації комплексів досліджуваних похідних акридону й іммобілізованої ДНК.

Іммобілізацію ДНК на сенсорній поверхні проводили введенням у вимірювальну комірку 40 мкл 30 мкг/мл (~ 15 нМ) розчину ДНК pTz19R у 0,5 М KH_2PO_4 , рН 3,8. При цьому спостерігався суттєвий сенсорний відгук. Зміна сигналу на $\sim 0,07$ кутового градуса порівняно з шумом приладу (0,001–0,002 кутового градуса) надійно свідчить про іммобілізацію ДНК на сенсорній поверхні. Слід відмітити, що приблизно однакову зміну сенсорного сигналу можна спостерігати як у розчині для іммобілізації, так і в робочому буферному розчині після промивання цим розчином, що безумовно підтверджує наш

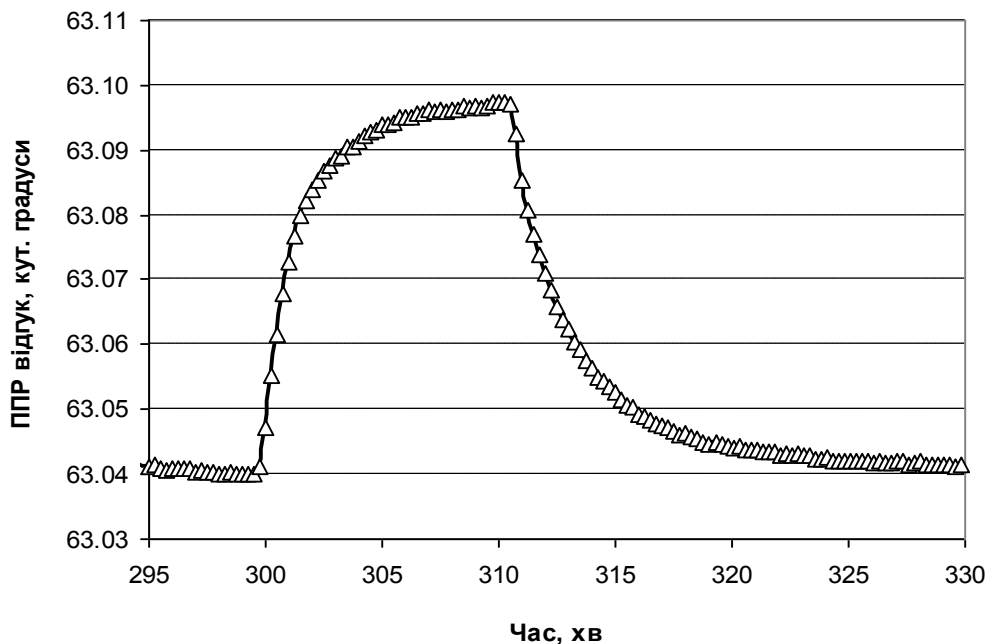


Рис. 2. Типовий відгук сенсора ППР: до 300 хв – базова лінія, 300–310 хв – стадія асоціації, з 310 хв – стадія дисоціації.

висновок про успішну іммобілізацію ДНК (рис. 3). Натомість, введення у вимірювальну комірку розчину ДНК pTz19R тієї ж концентрації в інших умовах (у буфері, що містить трис та ЕДТА, рН 8), не викликає помітного сенсорного відгуку, тобто в таких умовах ефективної іммобілізації ДНК не відбувалося. Таким чином, за допомогою спектрометрії ППР було показано, що ефективна іммобілізація ДНК на робочій поверхні сенсора відбувається у 0,5 М $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ при рН 3,8.

Після обробки сенсорної поверхні 5 мМ розчином МКГ у вимірювальну комірку послідовно вводили розчини похідних акридону у концентраціях 5–25 мкг/мл в робочому буферному розчині. В умовах експерименту спостерігається практично повне відмивання досліджуваних речовин від іммобілізованої ДНК за 20–30 хв (рис. 4), що дає змогу використовувати сенсорну поверхню однієї пластинки для дослідження не менш ніж 15–20 зразків. У контрольних дослідах розчини похідних акридону вводили у вимірювальну комірку, сенсорну поверхню якої було оброблено тільки МКГ (без ДНК).

За допомогою програмного забезпечення, що розробляється авторами даної роботи, на основі отриманих сенсограм були розраховані величини констант швидкості асоціації та дисоціації лігандів і ДНК, а також їхніх рівноважних констант. Ці попередні результати показують, що всі похідні акридону, які досліджували в даній роботі, мають більш високу спорідненість до іммобілізованої ДНК, ніж до контрольної поверхні, обробленої тільки МКГ (див. таблицю). Схоже, що це обумовлено, головним чином, стадією дисоціації: константи швидкості дисоціації у випадку контрольної поверхні більші, ніж поверхні, обробленої ДНК. Найвище значення рівноважної константи асоціації K_{ass} до ДНК отримано для одного з похідних акридону – „15“. Варто підкреслити, що цей амід акридон-4-

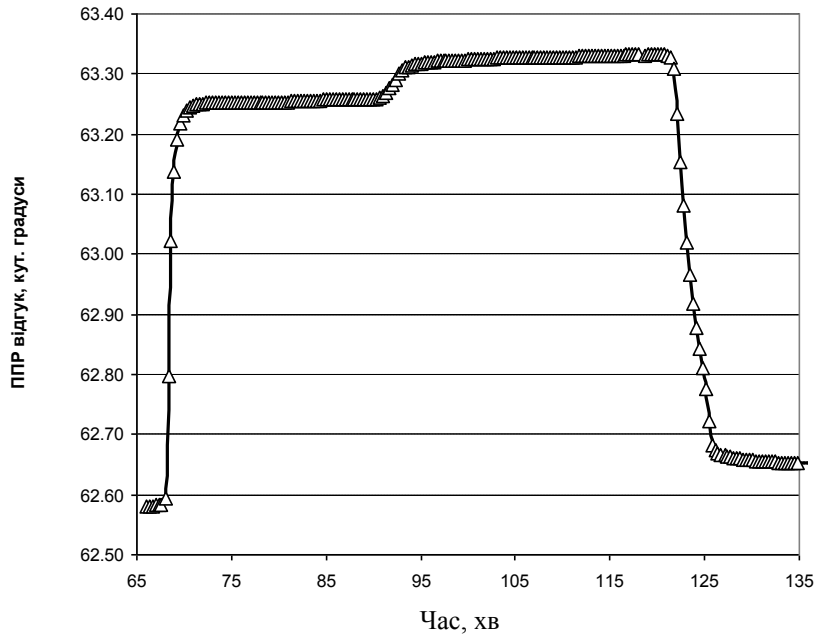


Рис. 3. Сенсограма, що відображає процес іммобілізації ДНК на сенсорній поверхні. До 68 та після 121 хв використовували робочий буферний розчин, а з 68 по 121 хв – розчин для іммобілізації. Розчин ДНК для іммобілізації було введено на 88 хв.

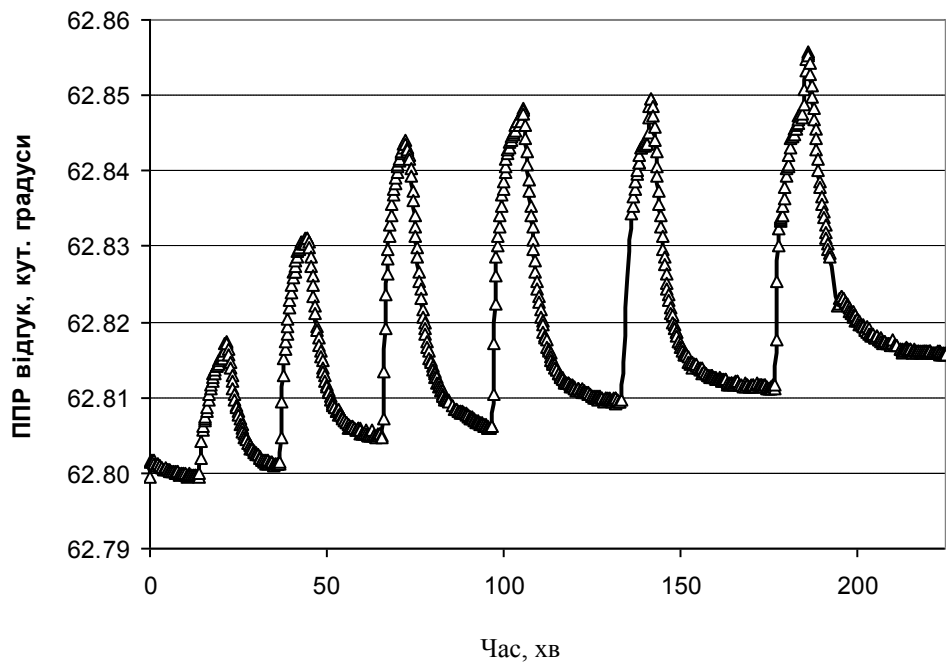


Рис. 4. Сенсограма, що відображає введення серії зразків різної концентрації.

карбонової кислоти повністю пригнічує релаксацію ДНК топоізомеразою I *in vitro* в концентрації 25 мкг/мл і значно інгібує синтез РНК у модельній системі транскрипції з використанням ДНК-залежної РНК-полімерази фагу T7 за тієї ж концентрації.

Кінетичні параметри взаємодії деяких похідних акридону з ДНК, іммобілізованою на сенсорній поверхні спектрометра ППР та контрольною поверхнею (обробленою тільки МКГ)

Похідні акридону	ДНК та МКГ			МКГ		
	$k_{ass}, M^{-1} \times сек^{-1}$	$k_{dis}, сек^{-1}$	K_{ass}, M^{-1}	$k_{ass}, M^{-1} \times сек^{-1}$	$k_{dis}, сек^{-1}$	K_{ass}, M^{-1}
„10“	77,6	0,00020	$3,88 \times 10^5$	63,0	0,00060	$1,05 \times 10^5$
„15“	39,9	0,00007	$5,70 \times 10^5$	44,1	0,00030	$1,47 \times 10^5$
„25“	76,0	0,00097	$0,76 \times 10^5$	60,2	0,00221	$0,27 \times 10^5$

Таким чином, у даній роботі показана принципова можливість вивчення взаємодії низькомолекулярних сполук на прикладі похідних акридону з ДНК методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням спектрометра ППР „Плазмон SPR-4m“. За допомогою розробленого нами програмного забезпечення розраховані попередні значення кінетичних констант взаємодії досліджуваних речовин з іммобілізованою ДНК. Отримані результати є підставою для подальшого вивчення механізмів дії низькомолекулярних синтетичних біорегуляторів у сукупному застосуванні молекулярно-біологічних і біосенсорних методів дослідження.

1. *Авілов С. В., Александрова Н. О., Кунда Є. М.* та ін. Застосування соєвого інгібітора трипсину для модифікації поверхні золота сенсорних чипів спектрометра поверхневого плазмонного резонансу // Укр. біохім. журн. 2004. Т. 76. № 3 С. 98–103.
2. *Бенілова І. В., Солдаткін О. П., Рачков О. Е.* та ін. Дослідження ефективності іммобілізації нюхових рецепторів людини на сенсорному чипі за допомогою спектрометра ППР „Плазмон SPR-4m“ // Дослідження в галузі сенсорних систем та технологій: Зб. наук. пр. К., 2006. С. 41–50.
3. *Beketov G. V., Shirshov Yu. M., Shynkarenko O. V.* et al. Surface plasmon resonance spectroscopy: prospects of superstrate refractive index variation for separate extraction of molecular layer parameters // Sens. and Actuat. B. 1998. Vol. 48. N 1–3. P. 432–438.
4. *Belmont P., Bosson J., Godet T., Tiano M.* Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? // Anti-Cancer Agents Medicin. Chem. 2007. Vol. 7. N 2. P. 139–169.
5. *Boozer C., Kim G., Cong S.* et al. Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies // Curr. Opin. Biotech. 2006. Vol. 17. N 4. P. 400–405.
6. *Boumendjel A., Macalou S., Ahmed-Belkacem A.* et al. Acridone derivatives: Design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2 // Bioorg. Med. Chem. 2007. Vol. 15. N 8. P. 2892–2897.
7. *Dheyongera J. P., Geldenhuys W. J., Dekker T. G.* et al. Antimalarial activity of thioacridone compounds related to the acronycine alkaloid // Bioorg. Med. Chem. 2005. Vol. 13. N 5. P. 1653–1659.
8. *Endres C. J., Hsiao P., Chung F. S.* et al. The role of transporters in drug interactions // Eur. J. Pharm. Sci. 2006. Vol. 27. N 5. P. 501–517.

9. Goodell J. R., Madhok A. A., Hiroshi H. et al. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. Vol. 14. N 16. P. 5467–5480.
10. Hegde R., Thimmaiah P., Yerigeri M. C. et al. Anti-calmodulin acridone derivatives modulate vinblastine resistance in multidrug resistant (MDR) cancer cells // *Eur. J. Med. Chem.* 2004. Vol. 39. N 2. P. 161–177
11. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. Vol. 377. N 3 .P. 528–539.
12. Nguyen B., Tanious F. A., Wilson W. D. Biosensor-surface plasmon resonance: Quantitative analysis of small molecule–nucleic acid interactions // *Methods.* 2007. Vol. 42. N 1. P. 150–161.
13. Vasjari M., Shirshov Y. M., Samoylov A. V. et al. SPR investigation of mercury reduction and oxidation on thin gold electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 2007. Vol. 605. N 1. P. 73–76.
14. Visalli R. J., van Zeijl M. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy // *Antiviral Res.* 2003. Vol. 59. N 2. P. 73–87.
15. Wallstab A., Koester M., Boehme M. et al. Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918 // *Br. J. Cancer.* 1999. Vol. 79. N 7/8. P. 1053–1060.
16. Zarubaev V. V., Slita A. V., Krivitskaya V. Z. et al. Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro // *Antiviral Res.* 2003. Vol. 58. N 2. P. 131–137.

**INVESTIGATION OF POSSIBILITY TO USE THE METHOD OF SURFACE
PLASMON RESONANCE FOR STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN
ACRIDONE DERIVATIVES AND DNA**

O. Rachkov*, Yu. Ushenin, Yu. Holodova*, V. Negrutsk*,
L. Palchikovska*, O. Soldatkin***

**Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
150, Zabolotnyi St., Kyiv 03143, Ukraine
e-mail: oleksandr_rachkov@yahoo.com*

***V.E. Lashkarev Institute of Semiconductor Physics of NAS of Ukraine
41, Nauki Ave., Kyiv 03028, Ukraine*

Possibility for investigation of interactions between synthetic low-molecular weight acridone derivatives and DNA by the method of surface plasmon resonance using spectrometer *Plasmon SPR-4m* was shown. Spectrometry of surface plasmon resonance allows real-time monitoring the process of DNA immobilization on gold surface of a sensor chip, as well as observing interactions between the immobilized DNA and the acridone derivatives. Parameters of interactions between immobilized DNA and the acridone derivatives, obtained by the method of surface plasmon resonance, are in good correlation with the results of biological activity studies on the acridone derivatives in enzyme systems *in vitro*.

Key words: surface plasmon resonance, acridone, DNA, molecular interactions.

Стаття надійшла до редколегії 21.02.08

Прийнята до друку 24.03.08