

УДК 577.34

ГИДРАТАЦИЯ ПРОИЗВОДНОГО АКТИНОЦИНА И ЕГО ИНТАКТНОГО И γ -ОБЛУЧЕННОГО КОМПЛЕКСОВ С ДНК ПО ДАННЫМ КВЧ ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ

О.В. Хорунжая, В.А. Кашпур, А.А. Красницкая, В.Я. Малеев

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины,
ул. Академика Проскуры, 12, г. Харьков, 61085, Украина
E-mail: dubovits@ire.kharkov.ua*

Статья поступила в редакцию 17 марта 2003 г.

Методом КВЧ диэлектрометрии ($\lambda=7.6$ мм) проведены измерения комплексной диэлектрической проницаемости водно-солевого раствора (0.08 M NaCl) производного актиноцина с двумя метиленовыми группами в аминокислотных цепочках (ActII). Исследованы также диэлектрические свойства водно-солевых растворов необлученного и γ -облученного в дозе 800 Гр комплекса ДНК-ActII (P/D=5). Рассчитана степень гидратации h (число молекул воды в пересчете на одну молекулу лиганда или один нуклеотид ДНК) для всех изученных веществ. Установлено, что для ActII величина $h=22$, для комплекса ДНК-ActII степень гидратации превышает 30, а γ -облучение комплекса приводит к снижению величины h на 18%. Полимерность образцов определена методом гель-электрофореза. Установлено, что облученный комплекс ДНК-ActII значительно подвижнее и характеризуется большей фрагментарностью по сравнению с необлученным.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: производное актиноцина, комплекс ДНК с производным актиноцина, гидратация, γ -облучение, КВЧ диэлектрометрия, электрофорез.

В связи с разработкой противоопухолевых препаратов представляет интерес изучение новосинтезированных соединений, являющихся производными актиноцина, содержащими аминокислотные цепочки с разным числом метиленовых групп. В опытах *in vivo* было установлено [1], что наибольшей эффективностью обладает производное актиноцина с двумя метиленовыми группами в боковых цепочках: актиноцил-бис-(3-диметиламиноэтил)амин (ActII). В нем к амидным группам в положениях 1 и 9 феноксазонового хромофора присоединены диметиламиноэтильные группировки, терминальный атом азота которых в водных растворах заряжен положительно (рис. 1).

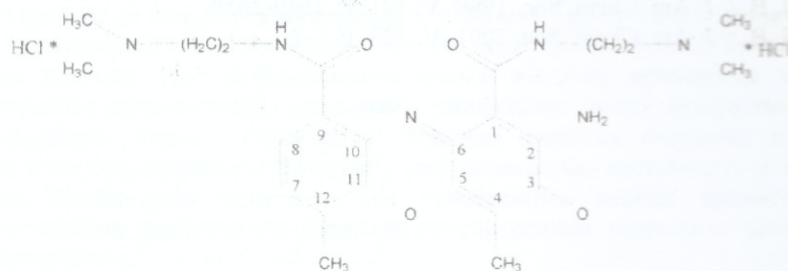


Рис.1. Структурная формула актиноцил-бис-(3-диметиламиноэтил)амин (Act II).

Для выяснения природы специфического взаимодействия лигандов с ДНК и стабилизации возникающих комплексов, что необходимо для целенаправленного синтеза противоопухолевых препаратов, требуется построение адекватных моделей комплексообразования. В связи с этим, ранее различными методами изучали константы связывания производных актиноцина с ДНК при различных ионных силах [2], термодинамические параметры взаимодействия этих веществ с ДНК [3,4], влияние гидратации на образование комплексов в пленках [4,5], энергетику и гидратацию комплексов олигонуклеотид-ActII-V в компьютерном эксперименте [5]. Было установлено, что по сравнению с производными актиноцина, содержащими от 3-х до 5 метиленовых групп в цепочках, лиганд ActII образует наиболее стабильный комплекс с ДНК.

Возникает вопрос, какова причина этой повышенной стабильности. Как известно, весьма существенный вклад в энергию стабилизации макромолекул вносит ион-гидратное окружение. При изучении влажных пленок комплексов было оценено, что вклад молекул воды в общую энергию стабилизации ДНК и комплексов составляет 50-60% [4]. Было также показано, что высокая стабильность комплекса ДНК-ActII определяется, вероятно, большей, по сравнению с чистой ДНК, упорядоченностью его гидратного окружения. При этом константы связывания воды с этим комплексом в 2 раза выше, чем с производными актиноцина, имеющими 3, 4 или 5 метиленовых групп в боковых цепочках.

Однако экспериментальные данные о степени гидратации ActII и его комплекса с ДНК, особенно в условиях, приближенных к естественным, т.е. в растворах, практически отсутствуют. Ранее было показано, что определить количество связанных с веществом молекул воды, которые по своим динамическим характеристикам отличаются от молекул воды в объемной фазе, позволяет метод дифференциальной КВЧ диэлектromетрии [6].

Целью настоящей работы является изучение диэлектрических свойств и степени гидратации лиганда ActII, его комплекса с ДНК, а также изменений в ион-гидратной оболочке комплекса ДНК-ActII, сопровождающих изменения структуры комплекса под действием γ -радиации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась тимусная ДНК (натриевая соль), выделенная в лаборатории профессора Ландо Д.Ю. (Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск) с молекулярной массой $M > 10^7$ Да и гиперхромным эффектом $h = 38\%$ при $\lambda = 260$ нм. Препарат ActII был синтезирован Глибиным Е.Н. с сотрудниками (Санкт-Петербургский государственный технический университет, Россия) и использовался без дополнительной очистки, его спектральные и аналитические характеристики приведены в работах [7,8]. При определении концентрации ActII в растворе использовали значение молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{400} = 1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [9]. Ионная сила исследовавшихся растворов составляла 0,08 М NaCl. Изучались комплексы ДНК с ActII при P/D=5 (отношение молей фосфатов ДНК к молям лиганда). Облучение раствора комплекса проводили на установке "Исследователь" γ -квантами ^{60}Co при мощности экспозиционной дозы 265 Р/мин. Поглощенная доза радиации – 800 Гр.

Концентрацию ActII и ДНК в растворе определяли с помощью спектрофотометра Specord M40 (Германия). Степень гидратации находили по комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon''$ в миллиметровом диапазоне длин волн (7,6 мм) с помощью дифференциального диэлектromетрического метода. Электропроводность растворов измеряли на частоте 10 кГц мостом переменного тока P568 в ячейке с платиновыми электродами. Степень полимерности ДНК и комплексов оценивалась, как и ранее [10], с помощью гель-электрофореза при использовании в качестве маркера рестрикта ДНК фага λ -Hind III. Для получения денситограмм негативы с изображением электрофореграмм сканировали с сохранением в виде графических файлов в формате *.bmp, которые затем обрабатывали на компьютере при помощи программы MATLAB 6.1, позволяющей получить информацию о распределении цветовой яркости (соответствующей распределению концентрации) образца вдоль пути, пройденного им под действием электрического поля. Для представления полученных данных в единицах оптической плотности D использовали контрольные денситограммы маркерной ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл.1 приведены известные величины ϵ' и ϵ'' воды и найденные разности $\Delta\epsilon'$ и $\Delta\epsilon''$ между значениями этих параметров воды и исследовавшихся растворов. В величину $\Delta\epsilon''$ вводилась поправка на возрастание электропроводности раствора $\Delta\sigma$ по сравнению с водным раствором 0,08 М NaCl. Величины $\Delta\epsilon_s$ является разностями между диэлектрической постоянной воды ϵ_0 и значениями ϵ_s – низкочастотными пределами величин ϵ' исследовавшихся образцов, вычисленных с использованием теории Дебая полярных жидкостей, которая справедлива для растворов биополимеров при данных частотах. В последней строке таблицы приведены значения степени гидратации h (число молекул воды в пересчете на одну молекулу лиганда (столбец 4) или один нуклеотид ДНК (столбцы 3, 5, 6)) для всех изученных веществ.

Таблица 1.

Диэлектрические характеристики растворов ДНК, ActII, комплекса ДНК-ActII и γ -облученного комплекса ДНК-ActII

Параметры \ Раствор	Вода	ДНК	Act II	Комплекс ДНК-ActII	Комплекс ДНК-ActII, 800 Гр
ϵ'	16,48	-	-	-	-
$\Delta\epsilon'(\pm 0,01)$	-	0,05	0,09	0,04	-0,10
ϵ''	27,77	-	-	-	-
$\Delta\epsilon''(\pm 0,01)$	-	0,21	0,38	0,52	0,40
$\Delta\sigma(\pm 0,01) \times 10^3, \text{ Ом}^{-1}$	-	2,20	0,73	2,97	3,30
ϵ_0	79,9	-	-	-	-
$\Delta\epsilon_s(\pm 0,04)$	-	0,81	0,73	1,71	1,50
$h(\pm 1)$, связанных молек. H_2O	-	15	22	34	28

Измерения диэлектрических характеристик раствора ДНК проводили при концентрации 0,47% и температуре 20°C. Степень гидратации ДНК составила 15 молекул связанной воды на один нуклеотид, что соответствует существующим оценкам.

Диэлектрические свойства лиганда ActII изучали в водном растворе в концентрации 0,38% при температуре 20°C. Используя значение константы димеризации ActII $k_{\text{димер}}=15880$, мы определили, что ActII находился преимущественно в форме димера (88%). Для расчета степени гидратации лиганда принимался во внимание тот факт, что на каждую молекулу ActII приходится две молекулы HCl (рис. 1), которые также вносят вклад в декремент диэлектрической проницаемости $\Delta\epsilon_s$. Соответствующий эффект рассчитывался из известной величины снижения ϵ_s для HCl равной 46 моль⁻¹ [11]. В таблице 1 величины $\Delta\epsilon_s$ для ActII даны за вычетом этого вклада. Видно, что лиганд обладает более высокой гидратационной активностью по сравнению с нуклеотидом в ДНК: число h связанных с молекулой ActII молекул воды составляет около 22.

Ранее методом молекулярной динамики была сделана оценка степени гидратации ActII [12]. Из этих данных следует, что в условиях нашего эксперимента с одной молекулой лиганда в среднем может быть связано 6-7 молекул воды, что существенно меньше, чем определено диэлектрическими измерениями. По-видимому, это различие обусловлено тем, что при расчетах методом молекулярной динамики не учитываются в качестве связанных те молекулы растворителя, которые взаимодействуют с молекулами воды, связанными с такими гидратно-активными центрами как O28, O30, O34, HN35, HN37 [12], также обладающими существенно сниженной подвижностью. ИК измерения указывают также на существование в ActII и иных гидратно-активных сайтов (например, C=N и др.) [1,5].

В пятом столбце таблицы приведены диэлектрические характеристики раствора комплекса ДНК (концентрация 0,57%) с ActII (концентрация 0,19%). Видно, что электропроводность раствора комплекса является суммой величин электропроводности растворов ДНК и ActII и соответствует величине, рассчитанной из табличных значений коэффициентов подвижностей свободных ионов H⁺ и Cl⁻. Величина $\Delta\epsilon_s$ приведена с учетом вклада ионов H⁺ и Cl⁻ в диэлектрическую проницаемость раствора.

Вычисленное значение h гидратации комплекса составило в пересчете на один нуклеотид (как участвующий в комплексообразовании, так и не участвующий) 34 молекулы воды. Ранее было установлено, что образование комплекса ДНК с производными актиноцина осуществляется либо по типу интеркаляции (встраивание хромофорных колец между GC-парами), либо по типу внешнего связывания [2,5]. На основании результатов работы [2] рассчитано, что в нашем эксперименте для отношения P/D=5 и ионной силы 0,08 M NaCl концентрация интеркалированных молекул ActII составила 12% (т.е. 1/8 общего количества молекул лиганда). Это соответствует одной интеркалированной молекуле лиганда на 20 пар нуклеотидов. Возрастание степени гидратации h комплекса по сравнению со значениями величины h для ДНК и ActII означает, что связывание ДНК с ActII (по любому указанному типу) приводит к появлению дополнительных связанных молекул воды в гидратной оболочке комплекса.

Расчеты комплекса ДНК-ActII методом Монте-Карло показали, что комплекс стабилизируется благодаря существованию двух молекул воды, занимающих мостиковое положение между гидратно-активными группами ДНК и лиганда (внешнее связывание) или благодаря наличию шести мостиковых молекул воды с одновременным образованием водородных связей между катионными группами ActII и атомами O4' дезоксирибоз сахарофосфатного остова ДНК (интеркаляция). При этом число молекул воды, сильно связанных с комплексом, оказывается меньше, чем сумма молекул воды, связанных по отдельности с ДНК и ActII [5]. Диэлектрические измерения показывают, однако, что полная гидратация комплекса, включающая все молекулы воды с пониженной подвижностью (в том числе и находящиеся во второй гидратной оболочке), возрастает. Соответствующее изменение энергии должно приводить к дополнительной стабилизации комплекса.

Стабилизирующая роль гидратации в поддержании комплекса ДНК-ActII подтверждается исследованиями влияния γ -облучения на структурное состояние комплекса. Действительно, электрофоретическое исследование комплекса, облученного в дозе 800 Гр, указывает на сильную фрагментацию образца. На рис.2 представлены денситограммы растворов чистой ДНК, исходного и γ -облученного комплекса ДНК-ActII и маркера - рестрикта ДНК фага λ -Hind III. Видно, что чистая ДНК характеризуется полосой, которая близка к полосе маркера 23130 п.о. Полоса комплекса ДНК с лигандом отстает от полосы контрольной ДНК, т.е. длина и молекулярная масса комплекса больше чем у чистой ДНК. В то же время облученный комплекс занимает область маркерной кривой с позициями фрагментов гораздо меньшей величины: от менее 23130 до 564 п.о., при этом основная доля фрагментов имеет размер от 10000 до 1000 п.о.

С изменениями полимерности комплекса полностью коррелируют данные диэлектрических измерений. Из последней колонки таблицы 1 следует, что облучение комплекса (концентрации компонентов те же) в дозе 800 Гр приводит к уменьшению степени гидратации h от 34 молекул связанной воды в пересчете на нуклеотид до 28 молекул, т.е. на 18%. Это свидетельствует, как и в случае облучения чистой ДНК [10], о частичном разрушении гидратной оболочки комплекса. При этом величина дегидратации близка к соответствующей величине для чистой ДНК, облученной в дозе 370 Гр, что

указывает, по-видимому, на отсутствие влияния лиганда ActII на радиационную устойчивость ДНК. Видно также, что при облучении электропроводность комплекса возрастает на 14%. Этот рост может быть обусловлен образованием пострadiационных разрывов, сопровождаемым, как и в случае облученной ДНК [10,13], освобождением дополнительных ионов Na^+ .

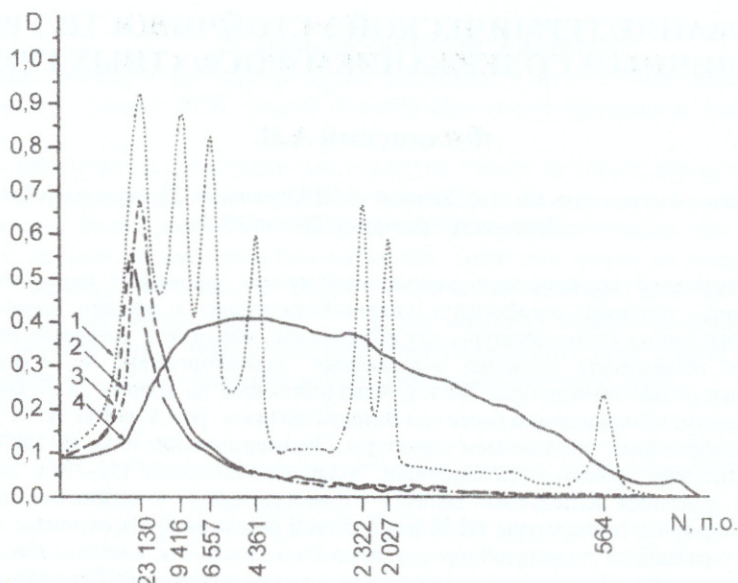


Рис.2. Денситограммы исследуемых образцов: 1 – рестрикт ДНК фага λ -Hind III, 2 – ДНК из тимуса телянка, 3 – комплекс ДНК-ActII, 4 – комплекс ДНК-ActII, облученный в дозе 800 Гр.

Таким образом, показана эффективность метода КВЧ диэлектротрии в изучении природы стабильности комплекса ДНК-лиганд. Представляет интерес продолжить исследование, используя комплексы ДНК с производными актиноцина, содержащими боковые цепочки другого типа.

ВЫВОДЫ

С помощью метода КВЧ диэлектротрии изучено взаимодействие с водно-ионным растворителем лиганда ActII и комплекса ДНК с ActII, а также влияние γ -облучения на степень гидратации комплекса. Найдено, что комплексообразование сопровождается появлением во втором гидратном слое ДНК дополнительно связанных молекул воды, стабилизирующих комплекс. Гамма-облучение приводит к частичной дегидратации и фрагментации комплекса.

Авторы благодарят О.Т. Николова за проведение γ -облучения образцов ДНК на установке "Исследователь", Е.Б. Круглову за помощь при приготовлении раствора лиганда и В.И. Гудзенко за фотографирование электрофореграмм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anti-cancer drug design: Biologocal and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazone Derivatives/ Eds. A.N.Veselkov and D.B.Devies. Sevastopol: SEVNTU PRESS. 2002. 260 p.
2. Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н. //Вісн. Харк. ун-ту № 560. Біофізичний вісник. 2002. Вип.1(10). С.21-29.
3. Семенов М.А., Большух Т.В., Березняк Е.Г. и др. //Вісн. Харк. ун-ту №528. Біофізичний вісник. 2001. Вип.2(9). С.40-44.
4. Большух Т.В., Духопельников Е.В., Семенов М.А. //Вісн. Харк. ун-ту № 560. Біофізичний вісник. 2002. Вип.1(10). С.30-35.
5. Березняк Е.Г., Семенов М.А., Большух Т.В., и др. // Биофизика. 2002. Т.47. Вып.6. С.1005-1014.
6. Кашпур В.А., Дубовицкая О.В., Красницкая А.А., Малеев В.Я. //Радиофизика и электроника. 1997. Т.2. №2. С.153-155.
7. Глибин Е.Н., Плеханова Н.Г., Овчинников Д.В., Коршунова З.И. // Ж.Орг.Хим. 1996. Т.32. Вып.2. С.406-408.
8. Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г. // Ж.Орг.Хим. 1997. Т.33. Вып.10. С.1573-1576.
9. Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н. //Вісн. Харк. ун-ту № 560. Біофізичний вісник. 2002. Вип.1(10). С.12-20.
10. Кашпур В.А., Дубовицкая О.В., Красницкая А.А., Малеев В.Я. // Вісн. Харк. ун-ту № 410. Біофізичний вісник. 1998. Вип.1. С.111-115.
11. Ахатов Я.Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов, справочник, М. Наука, 1977. 400 с.
12. Анищенко Д.Б., Березняк Е.Г., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. //Вісн. Харк. ун-ту № 560. Біофізичний вісник. 2002. Вип.1(10). С.36-41.
13. Adinarayana M., Bothe E., Schulte-Frohlinde D. // Int. J. Radiat. Biol. 1988. V.54. P.723-733.