

УДК 5.77.32:5396.199

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ДВУХ ЛИГАНДОВ: АКТИНОЦИНОВОГО АНТИБИОТИКА И КОФЕИНА С ДНК

Е.Б. Круглова¹, Е.Л. Ермак²

¹ИРЭ НАН Украины, ул.Ака.Проскуры, 12, г. Харьков, 61085

e-mail:kruglova@ire.kharkov.ua

²Харьковский Национальный Университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, пл.Свободы, 4, 61077

Поступила в редакцию 12 мая 2003 г.

Спектрофотометрическим методом в видимой- и УФ-областях исследовано связывание актиноцинового антибиотика (ActIII) с ДНК в присутствии и в отсутствие кофеина в 8×10^{-2} М NaCl. Численный анализ концентрационных и температурных зависимостей спектров поглощения, проведенный с помощью программы оптимизации DALSMOD для двух моделей связывания, позволил получить константы и термодинамические параметры комплексообразования в системах ДНК - ActIII и ДНК- ActIII - кофеин. Показано, что в присутствии кофеина константы связывания для двух типов комплексов уменьшаются по сравнению с константами связывания ActIII с ДНК без кофеина. По модели конкурентного связывания была определена константа ассоциации кофеина с ДНК, которая составила величину порядка 820 M^{-1} . Вычисленные по методу Вант Гоффа значения величин ΔH и ΔS для разных типов комплексов в присутствии и в отсутствие кофеина различались, особенно существенно для второго типа комплекса и составили величины $\Delta S_2 = -9,4$ э.е. для ДНК - ActIII и $\Delta S_2 = +9,8$ э.е. для ДНК - ActIII - кофеин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спектрофотометрия, ДНК, актиноциновые антибиотики, энтропия, энтальпия связывания, кофеин, константы связывания.

Для эффективного лечения разных типов онкозаболеваний необходимо понимание механизмов действия противоопухолевых антибиотиков на молекулярном уровне. Требуют изучения также эффекты одновременного присутствия в организме человека нескольких биологически активных соединений, способных приводить к понижению терапевтической активности друг друга. К таким биологически активным веществам можно отнести и кофеин. Из литературных данных следует, что кофеин способен связываться с лекарственными препаратами, уменьшая их фармацевтическое действие [1,2,3]. Ранее было показано также, что кофеин понижает цитотоксический эффект ряда лигандов, таких, как доксорубин, ЕВ, митоксантрон, эллифицин и аналог доксорубина AD198 [2,4]. Вещества, активность которых снижает кофеин, как правило, являются интеркаляторами [1,2,3].

Механизм биологического действия кофеина можно объяснить его стэкингом с планарными полиароматическими молекулами - лигандами [3,5]. С другой стороны, понижение активности лекарственного препарата может быть связано не только с его непосредственным взаимодействием с кофеином, но и взаимодействием кофеина с различными клеточными компонентами, в том числе и с молекулой ДНК. В этом случае наблюдается конкурентное связывание двух лигандов с матрицей ДНК. В связи с этим представляет интерес изучение процессов комплексообразования разных антибиотиков с ДНК в присутствии кофеина. Целью данной работы являлось спектрофотометрическое изучение связывания кофеина с актиноциновыми антибиотиками, которые относятся к лекарственным препаратам ген-направленного действия [6], а также исследование влияния кофеина на термодинамические параметры их связывания с ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антибиотики актиноцинового ряда (ActII - ActV) с разной длиной метиленовых цепочек в боковых амидных группах были синтезированы Глибиным и др. [7] и использовались без дополнительной очистки. Структурные формулы актиноциновых антибиотиков приведены в работах [6,8]. При определении концентрации исследуемых антибиотиков использовали значение молярного коэффициента экстинкции в изобестической точке $\epsilon_{400} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [9]. Спектрофотометрические измерения проводили в термостатированных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1, 2 и 10 мм на спектрофотометре Specord M40 (Германия).

Константы димеризации антибиотиков и константы образования их ассоциатов с кофеином (CAF), а также молярные коэффициенты экстинкции мономерной (ϵ_m), димерной (ϵ_d) форм антибиотиков и комплексов Act-CAF, рассчитывались по оригинальной программе оптимизации DALS, предложенной Хартли и др. [10]. Для анализа комплексообразования в системах ДНК-ActIII и ДНК-ActIII-кофеин мы использовали модели, детально описанные в работе [8], и программу оптимизации DALSMOD [11]. Модель I. Связывание антибиотика с ДНК происходит с образованием только мономерно связанных и

агрегированных лигандов. (Модель I описывается уравнениями (1) - (3), (5), (6) [8], константа комплексообразования кофеина с ДНК $K_1 = 0$). Модель II. Связывание антибиотика с ДНК происходит с образованием двух типов комплексов (комплекса 1 и комплекса 2) на разных местах связывания p_2 и p_3 с константами связывания K_2 и K_3 , с учетом образования агрегатов на местах связывания p_2 . (Модель II описывается уравнениями (1) - (6) [8], константа комплексообразования кофеина с ДНК $K_1 = 0$).

Влияние кофеина учитывалось: 1) по изменению констант и термодинамических параметров комплексообразования ActIII с ДНК в присутствии кофеина по программе DALSMOD без учета связывания кофеина с ДНК; 2) по модели конкурентного связывания (оптимизируется константа комплексообразования кофеина с ДНК K_1) без учета связывания ActIII с CAF и 3) с учетом взаимодействия ActIII с CAF. Во втором и третьем случаях величина места связывания кофеина с ДНК p_1 была выбрана как $p_1=1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Актиномициновые антибиотики и кофеин в водных растворах могут образовывать как самоассоциаты, так и непосредственно взаимодействовать друг с другом, образуя гетероассоциаты. Это показано в работе [9] спектрофотометрическим методом на примере актиномицинового антибиотика ActII и в работах [6,12] методом ЯМР. На рис.1, а приведены экспериментальные спектры поглощения смесей ActIII-CAF, полученные при постоянной концентрации лиганда (C_D) и переменных концентрациях кофеина. Из рисунка хорошо видно, что с ростом концентрации кофеина происходит длинноволновое смещение полосы антибиотика, которое можно объяснить образованием комплекса ActIII-CAF. Одновременно с увеличением количества комплекса ActIII-CAF происходит уменьшение концентрации как мономерных, так и димерных частиц антибиотика, что приводит к отсутствию изобестической точки на спектрах поглощения смесей. На рис.1, б приведены спектры поглощения мономерной формы ActIII и его комплекса с CAF, рассчитанные по программе оптимизации DALС с учетом двух химических уравнений:



В расчетах использовались молярные коэффициенты экстинкции для мономерной и димерной форм ActII - ActV, определенные ранее в работе [9]. Поскольку константа самоассоциации кофеина невелика [13], мы не учитывали образования его димерных частиц при расчетах равновесного состава смесей Act с CAF.

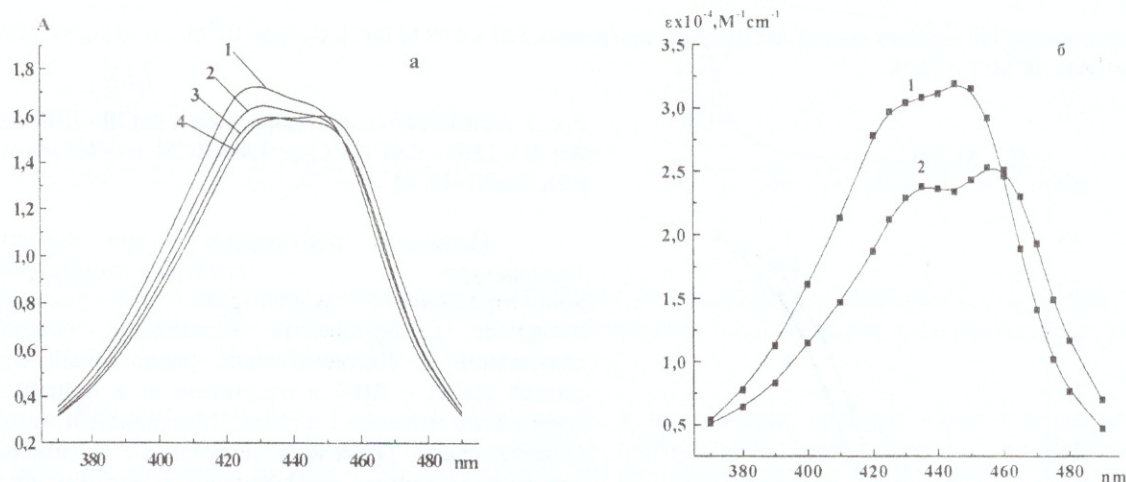


Рис. 1. Спектры поглощения смесей ActIII с CAF при постоянной концентрации антибиотика $C_D=6,3 \times 10^{-5}$ М и $C_{\text{CAF}} = 0$ М (1); $C_{\text{CAF}} = 9,8 \times 10^{-4}$ М (2); $C_{\text{CAF}} = 1,8 \times 10^{-3}$ М (3); $C_{\text{CAF}} = 3,3 \times 10^{-3}$ М (4) (а). Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции: 1 - мономерной формы ActIII, 2 - комплекса ActIII-CAF (б).

В таблице 1 приведены значения констант ассоциации разных актиномициновых антибиотиков с CAF, полученные нами в данной работе, а также константа ассоциации акридинового оранжевого (АО) с CAF [3].

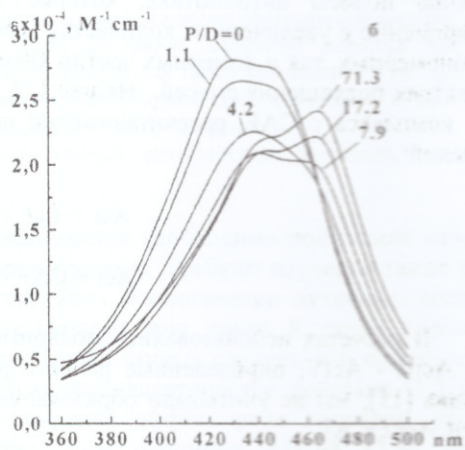
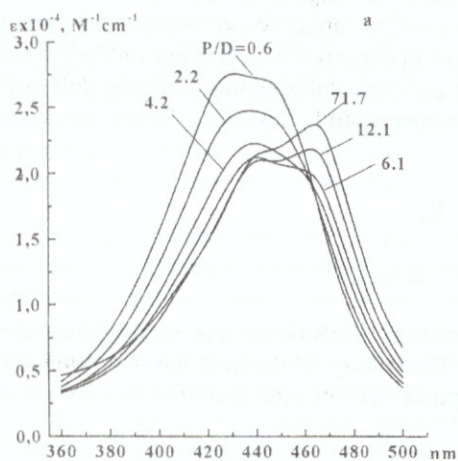
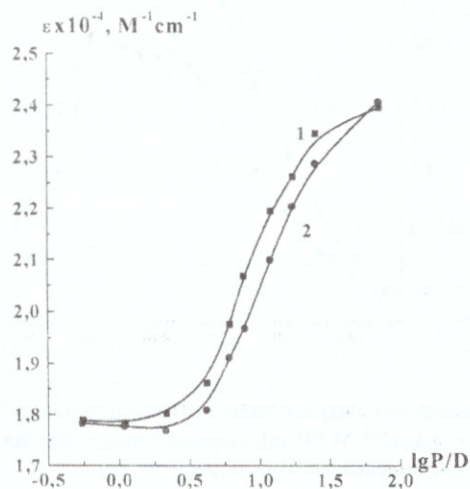
Таблица 1. Значения констант гетероассоциации актиноциновых антибиотиков с кофеином.

	ActII	ActIII	ActV	AO ¹⁾
C_{NaCl} , M	0,08	0.06	0.08	0.15
$K_{Act-CAF}$, M ⁻¹	337±17	352±42	331±11	256±5

1) Данные получены в работе [3].

Из таблицы 1 следует, что для всех рассмотренных лигандов значения констант гетероассоциации близки по величине. Это можно объяснить 1) одинаковым типом связывания кофеина с ароматическими кольцами лигандов и 2) тем, что длина метиленовой цепочки не влияет на связывание ActIII с кофеином.

На рис. 2. приведены спектры поглощения смесей ДНК-ActIII и ДНК-ActIII-CAF при разных концентрациях ДНК в 0,08M NaCl. Сравнивая их, можно отметить, что не существует ярко выраженных различий между спектрами поглощения смесей без кофеина и в его присутствии. Однако такие различия видны при сравнении концентрационных зависимостей поглощений смесей при одних и тех же значениях P/D, где P/D – отношение общей концентрации ДНК (в M фосфатов) к концентрации антибиотика (рис. 3).

Рис. 2. Спектры поглощения смесей Act III - ДНК при разных P/D в 0,08 M NaCl; $C_D=2,9 \times 10^{-5}$ M; (а) – $C_{CAF}=0$; (б) – $C_{CAF}=1,44 \times 10^{-4}$ M, $T = 20$ °C.Рис. 3. Зависимости поглощений смесей Act III - ДНК (1) и Act III - ДНК - CAF (2). $C_{CAF}=1,44 \times 10^{-4}$ M в $\lambda=465$ nm от P/D; $C_D=2,9 \times 10^{-5}$ M.

Используя полученные при комнатной температуре спектрофотометрические концентрационные зависимости, мы рассчитали молярные коэффициенты экстинкции, константы связывания и, соответственно, равновесный состав смесей ActIII - ДНК в отсутствие и в присутствии кофеина по моделям I и II (см. Материалы и методы). Ниже на рис.4 приведены полученные оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции для разных типов комплексов в системе ActIII - ДНК - CAF, рассчитанных по программе DALSMOD для модели I (рис.4, а) и модели II (рис.4, б). А на рис.5 показано, как доля каждого типа комплексов меняется в зависимости от P/D. В таблице 2 приведены оптимальные значения констант комплексообразования. Расчеты показали, что обе модели хорошо описывают наблюдаемые спектрофотометрические концентрационные зависимости. Это следует из сравнения величин факторов

Гамильтона R и R_{lim} , где R_{lim} – предельное значение фактора Гамильтона, рассчитываемое с учетом ошибок в измерении оптических плотностей и общих концентраций реагирующих компонентов [10].

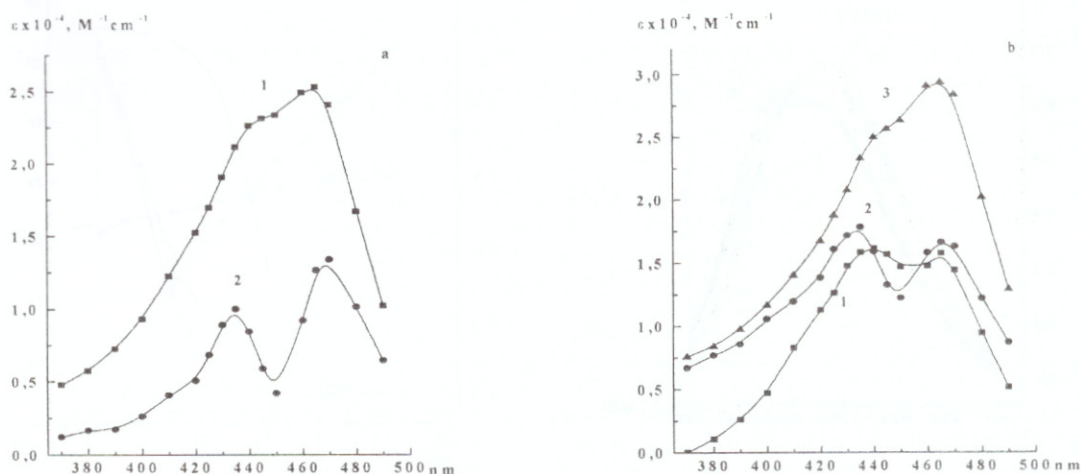


Рис. 4. Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции для разных типов комплексов ActIII с ДНК, рассчитанные по модели I (а) и модели II (б) при $C_{NaCl}=8 \times 10^{-2} M$: 1-мономерно связанный лиганд, 2-агрегированный лиганд, 3-комплекс по второму типу связывания.

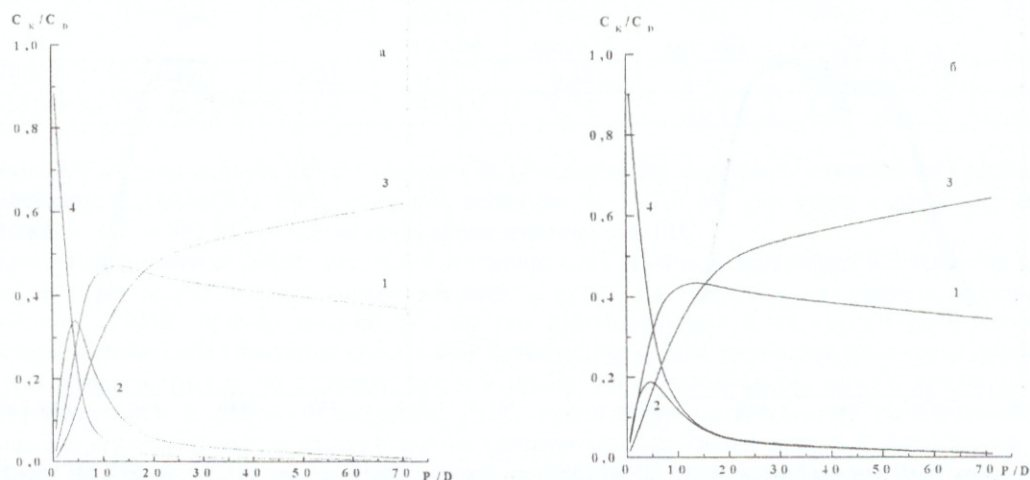


Рис. 5. Зависимости относительных концентраций разных типов комплексов, рассчитанные по модели II при оптимальных K_2 и K_3 (Таблица 2) от P/D в $8 \times 10^{-2} M$ NaCl (обозначения 1, 2, 3 как на рис. 4, 4 – свободный лиганд): (а) – $C_{CAF}=0$; (б) – $C_{CAF}=1.44 \times 10^{-4} M$, $C_D=2.9 \times 10^{-5} M$.

Как видно из рис. 5, а, б и Таблицы 2, в присутствии кофеина константы связывания антибиотика с ДНК изменяются, что приводит к значительному уменьшению доли агрегатов и мономерно связанного лиганда. С ростом температуры поглощения смесей ActIII - ДНК - CAF меняются как в видимой, так и в УФ области спектра (рис. 6, а, б). Подобные изменения в спектрах поглощения фиксируются нами и для смеси ActIII – ДНК без кофеина (данные не приведены). Из рис. 6, б следует, что антибиотик существенно увеличивает температуру плавления ДНК, температуры плавления смесей с кофеином и без него различаются незначительно.

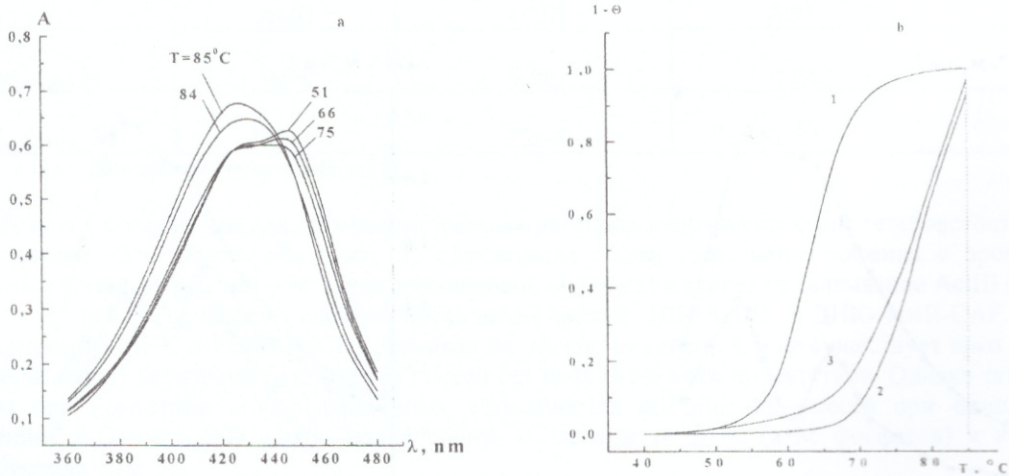


Рис.6. Спектры поглощения смеси ActIII – ДНК – CAF при разных температурах (приведены на рисунке) (а); ($C_{caf}=1,44 \times 10^{-4}$ M; $C_D=2,9 \times 10^{-5}$ M; P/D=25,5). Кривые плавления ДНК в отсутствие антибиотика (1), ДНК - ActIII при P/D=13 (2) и ДНК - ActIII-CAF при P/D=25,5; $C_{caf}=1,44 \times 10^{-4}$ M (3), построенные по изменению поглощения смесей в $\lambda=260$ нм в 8×10^{-2} M NaCl (б).

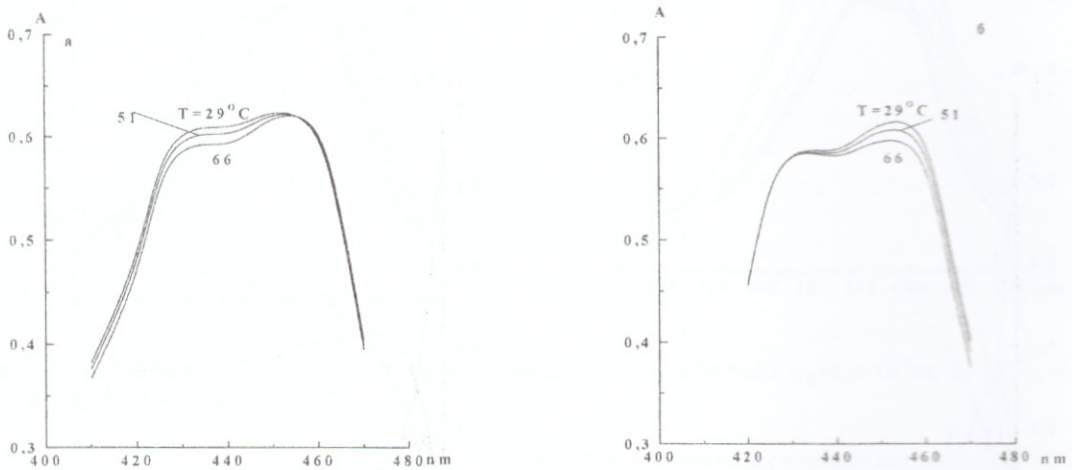


Рис.7. Спектры поглощения смеси ActIII-ДНК-CAF при разных температурах ($C_{caf}=1,44 \cdot 10^{-4}$ M; $C_D=2,9 \cdot 10^{-5}$ M; P/D=25,5), рассчитанные по модели I (а) и модели II (б).

Используя вычисленные по моделям I и II оптимальные величины констант связывания K_2 и K_3 для ActIII (см.таблицу 2) и молярные коэффициенты экстинкции, найденные нами в 0,08 M NaCl по моделям I и II, мы можем рассчитать, как величины этих констант меняются при повышении температуры. Для этого мы изначально фиксируем значения K_3 и молярные коэффициенты экстинкции для всех типов комплексов, найденные при комнатной температуре, меняем K_2 таким образом, чтобы сумма квадратов отклонений рассчитанного спектра экспериментального при каждой заданной температуре была минимальна. Найденные наилучшие значения K_2 теперь фиксируем и находим оптимальное значение K_3 . В расчетах учитывалось изменение константы димеризации ActIII от температуры, определенное ранее [9]. Найденные значения констант при разных температурах были использованы нами для расчетов спектров поглощений смесей ActIII-ДНК-CAF по двум моделям (рис.7, а, б). Видно, что модель I предполагает совершенно иной характер изменений поглощений смесей по сравнению с экспериментом (рис.6, а).

Полученные зависимости $\lg K_2$ и $\lg K_3$ от абсолютной обратной температуры приведены на рис.8, а, б. Видно, что эти зависимости линейны, следовательно, мы можем найти изменения энтальпии и энтропии при связывании лиганда с ДНК на разных местах связывания по закону Вант Гоффа:

$$-RT \ln K = \Delta H - T \Delta S$$

(3)

Полученные значения ΔH и ΔS приведены ниже в таблице 2.

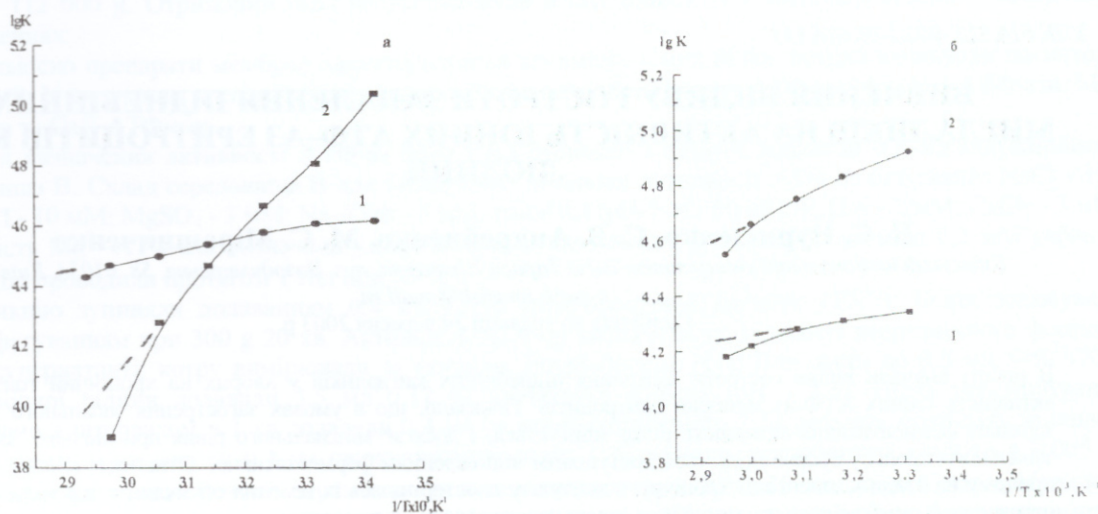


Рис.9. Зависимости логарифмов констант связывания K_2 (1) и K_3 (2) от абсолютной обратной температуры в растворе с концентрацией соли $C_{NaCl} = 8 \times 10^{-2}$ M, рассчитанных по программе DALSMOD для модели II как описано выше.

Таблица 2. Значения термодинамических параметров связывания ActIII с ДНК для двух типов комплексов рассчитанных по программе DALSMOD для модели II при концентрации соли $C_{NaCl} = 8 \times 10^{-2}$ M.

	$\lg K_2$	$\lg K_3$	$-\Delta G_2$, ккал/М	$-\Delta G_3$, ккал/М	$-\Delta H_2$, ккал/М	$-\Delta H_3$, ккал/М	ΔS_1 , э.е.	ΔS_2 , э.е.
ActIII - ДНК	4.67	5.02	6.36	6.84	1.15	9.62	+16.0	-9.4
ActIII-ДНК-CAF	4.36	4.95	5.90	6.74	1.77	3.83	+13.9	+9.8

Используя модель конкурентного связывания (оптимизация константы связывания кофеина с ДНК K_1 в программе DALSMOD), была получена величина $K_1 = 820 \text{ M}^{-1}$ без учета связывания кофеина с антибиотиком и $K_1 = 837 \text{ M}^{-1}$ с учетом связывания кофеина с ActIII.

Таким образом можно заключить, что в экспериментах *in vitro* присутствие биологически активного лиганда кофеина может существенным образом влиять на процессы связывания актиноциновых антибиотиков с ДНК, причем именно за счет его взаимодействия с молекулой ДНК. Поскольку в присутствии кофеина обе константы связывания антибиотика с ДНК уменьшаются и термодинамические параметры изменяются как по первому, так и второму типам комплексов, можно предположить, что кофеин размещается в одной из бороздок ДНК, препятствуя оптимальному размещению молекул лиганда. Это следует также и из уменьшения температуры плавления смесей в присутствии кофеина. Получаемая по модели конкурентного связывания константа связывания кофеина с ДНК невелика и, тем не менее, даже при концентрациях кофеина порядка $1,5 \times 10^{-4}$ M существенно сказывается на процессах связывания актиноциновых антибиотиков с ДНК. Энтропия комплексообразования по второму типу связывания существенно возрастает, что свидетельствует о разупорядочении структуры комплекса антибиотика ActIII с ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kapuscinski J., Kimmel M. //Bioph.Chem.. 1993. 46. P. 153-163.
2. Traganos F., Kaminska-Eddy B., Darzynkiewicz Z. //Cell Prolif. 1991. 24. P. 305-319.
3. Lyes M. B., Cameron I. L. //Bioph.Chem. 2002. 96. P. 53-76.
4. Traganos F., Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. //Cancer Res. 1991. 51. P. 3682-3689.
5. Sten H.J., Devore J.A., etc. //J.Phys.Chim. 1974. 78. P. 19-22.
6. Anticancer Drug Desing. Veselkov A.N., Davies D.B.: SEVNTU PRESS. 2002.
7. Глибин Е.Н. Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г. // ЖОр.Х., Т.33. В.10. С 1573-1576.
8. Круглова Е.Б., Гладковская Н.А. Малеев В.Я. //Біофізичний вісник (в печати).
9. Круглова Е.Б. и др. //Біофізичний вісник. 2002. 1(10). С. 12-20.
10. Solution equilibria. Hartley F., Burgess C., Alcock R.: Ellis Horwood. 1980. 360 p.
11. Круглова Е.Б. //Біофізичний вісник. 2001. 1(8). С. 27-41
12. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. // Eur.J.Biophys. 2001. V.30. P.354-366.
13. Kimura H., Ayoama T. J. Pharmacobiodyn. 1989. 12. P. 589