

Анализ взаимодействия антибиотика митоксантрона с ДНК в присутствии кофеина в водном растворе по данным ¹H-ЯМР спектроскопии

А. Н. Веселков, С. А. Высоцкий, М. П. Евстигнеев, Д. А. Веселков¹,
Л. Н. Дымант, П. А. Болотин, Д. Б. Дэвис¹

Севастопольский государственный технический университет
Студгородок, Севастополь, 99053, Украина

¹Беркбек колледж Лондонского университета
Гордон Хауз, 29, Лондон WC1N 0PP, Великобритания

Методом одно- и двумерной ¹H-ЯМР спектроскопии (500 МГц) изучено связывание антиопухолёвого антибиотика митоксантрона, или новантрона (NOV), с ДНК в присутствии кофеина (CAF) в водном растворе. Анализ комплексообразования молекул проведен на основе термодинамических параметров реакций самоассоциации и гетероассоциации NOV и CAF и взаимодействия лигандов с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCrA) в одинаковых экспериментальных условиях. Сделан вывод о сиквенс-специфичности связывания NOV с пиримидин-пуриновыми последовательностями исследуемого олигонуклеотида. Показано, что снижение эффективности NOV, интеркалирующего в ДНК при добавлении в раствор CAF, связано в значительной степени с блокированием молекулами кофеина мест посадки на олигонуклеотидной последовательности.

Введение. Синтетический антиопухолёвый антибиотик митоксантрон, или новантрон (NOV), используется в клинической практике ввиду его высокой эффективности при лечении рака молочной железы, лейкемии и лимфолейкоза [1]. Являясь модифицированным аналогом антибиотиков антрациклинового семейства, новантрон проявляет близкую к антрациклинам противоопухолёвую активность. Однако побочные эффекты кардиотоксичности NOV существенно снижены по сравнению, например, с дауномицином, что предполагает перспективу более широкого применения этого антибиотика в клинической практике [2].

До сих пор остаются невыясненными молекулярные механизмы и внутриклеточные места связывания новантрона, ответственные за противоопухолёвый эффект антибиотика [3]. Считается, что фармакологическое действие NOV обусловлено ин-

теркаляцией антибиотика в ДНК и ингибированием синтеза ДНК и РНК [1, 4, 5]. Однако, в отличие от большинства других интеркалирующих лигандов, антибиотик NOV не проявляет явной сиквенс-специфичности связывания с ДНК [4–8]. Авторы [7] полагают, что существенную роль в процессе узнавания антибиотиком определенных нуклеотидных последовательностей играют гидроксильные группы хромофора NOV. Результаты теоретического моделирования взаимодействия новантрона с дуплексом тетрамера ДНК [9] однозначно свидетельствуют о пиримидин-пуриновой (пуг-пуг) сиквенс-специфичности антибиотика, причем гуанин является более предпочтительным пуриновым основанием, чем аденин, в сайте связывания лиганда. Отмечается также возможность и внешнего, альтернативного интеркаляционному, связывания NOV в результате электростатического взаимодействия боковых цепей молекулы с заряженными фосфатными группами ДНК [6, 8, 10].

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, С. А. ВЫСОЦКИЙ, М. П. ЕВСТИГНЕЕВ,
Д. А. ВЕСЕЛКОВ, Л. Н. ДЫМАНТ, П. А. БОЛОТИН,
Д. Б. ДЭВИС, 2002

На основании изложенного можно заключить, что имеющиеся в литературе сведения о сиквенс-специфичности взаимодействия NOV с ДНК весьма ограничены и во многом противоречивы. Не был проведен также и термодинамический анализ реакций комплексообразования молекулы новантрона с нуклеиновыми кислотами. Вместе с тем информация о термодинамических параметрах комплексообразования молекул необходима для выяснения физической природы межмолекулярных взаимодействий, ответственных за процесс интеркаляции ароматического лиганда в ДНК [11].

Кофеин (CAF, 1,3,7-триметилксантин) относится к классу психомоторных стимуляторов [12]. Исследования показывают, что он обладает множественными эффектами на клеточном уровне, в частности, является ингибитором процесса репарирования в бактериальных системах [13, 14]. Принято считать, что биологическая активность CAF связана с его взаимодействием с биополимерами — белками и ДНК [14—16]. При этом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что кофеин уменьшает цитотоксическое действие некоторых красителей, например, бромистого этидия [17] и ряда антиопухолевых препаратов, таких как доксорубин и его аналоги, эллиптицин и др. [18—22]. В работах [21—23] сделан вывод о том, что CAF выступает в роли комплексообразователя — интерцептора ароматических биологически активных веществ, связывающихся с ДНК путем интеркаляции.

Для подтверждения данного вывода проведены исследования по гетероассоциации CAF с ароматическими биологически активными молекулами в растворе и предложены различные модели для интерпретации экспериментальных данных, которые подробно обсуждены в работах [24, 25]. Для анализа гетероассоциации ароматических молекул нами предложена статистико-термодинамическая модель, учитывающая образование бесконечномерных агрегатов как для реакций самоассоциации, так и гетероассоциации молекул на основе данных ЯМР спектроскопии [24, 25]. Эта модель была использована для определения структурных особенностей и термодинамических параметров гетероассоциации CAF с антибиотиком NOV в водном растворе [26]. Знание равновесных констант само- и гетероассоциации ароматических молекул CAF и антибиотика, а также их комплексообразования с дезоксирибонуклеотидами заданных последовательностей оснований в цепи позволяет рассчитать относительное содержание комплексов «ДНК—антибиотик» в присутствии CAF в растворе и тем самым сделать вывод о молекулярной природе дей-

ствия кофеина на фармакологическую активность ароматических антибиотиков. При этом важно отметить, что для проведения подобных расчетов экспериментальные исследования как само-, так и гетероассоциации ароматических лигандов, а также их комплексообразования с дезоксирибонуклеотидами должны быть проведены в идентичных экспериментальных условиях.

В настоящей работе методом одно- и двумерной ^1H -ЯМР спектроскопии изучено комплексообразование NOV с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGpCpA) в водном растворе. Ранее исследована самоассоциация антибиотика новантрона и гетероассоциация NOV с CAF в аналогичных экспериментальных условиях [26].

Материалы и методы. Кофеин и антибиотик новантрон («Sigma», США), структурные формулы которых представлены на рис. 1, использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99, 95 % D («Sigma») и растворяли в дейтерированном 0,1 М Na-фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА. Концентрацию ароматических молекул в водном растворе определяли спектрофотометрически: для CAF коэффициент экстинкции $\varepsilon = 9740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 273 \text{ nm}$) [27]; для NOV — $\varepsilon = 8360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 682 \text{ nm}$) [6]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат 5'-d(TrGpCpA) синтезирован компанией OSWEL DNA SERVICE (Великобритания). Образцы олигонуклеотида также лиофилизировали из D_2O и растворяли в дейтерированном 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА. 1M- и 2M- ^1H -ЯМР спектры измерены на спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц. Химические сдвиги необмениваемых протонов измеряли относительно внутреннего стандарта ТМА (бромид тетраметиламмония). Методика приготовления образцов и проведения эксперимента описана в [24, 25]. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах (308 и 318 К) в интервале концентраций тетрауклеотида от 2,49 до 0,04 ммоль/л и постоянном содержании NOV в растворе (0,5 ммоль/л) (рис. 2, а). Температурные зависимости химических сдвигов протонов молекул в смешанном растворе измерены в диапазоне температур от 310 до 356 К (рис. 2, б).

Результаты и обсуждение. Предварительно выполненное отнесение сигналов протонов NOV [26] и исследуемого дезокситетрануклеотида [28] позволило провести отождествление спектров смешанных растворов. В спектрах 2M-NOESY не наблюдались межмолекулярные кросс-пики между протонами NOV и тетрамера, как это имело место

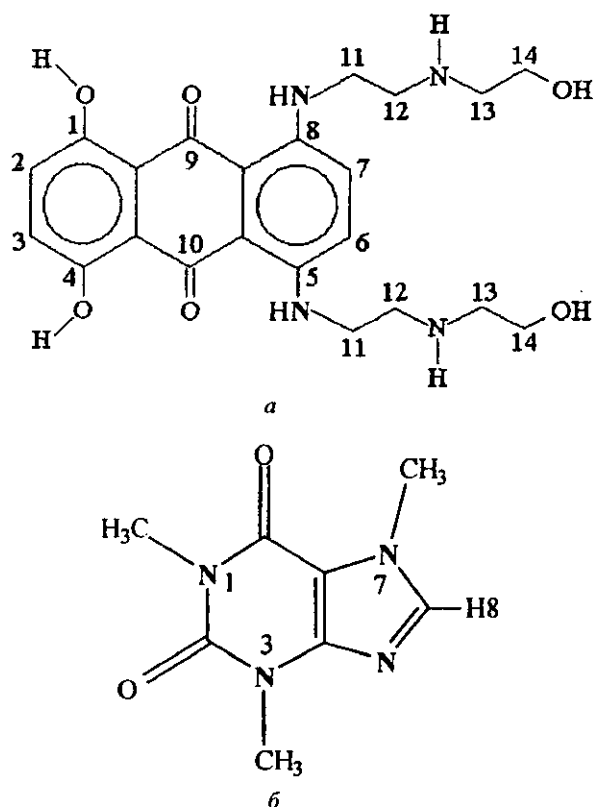


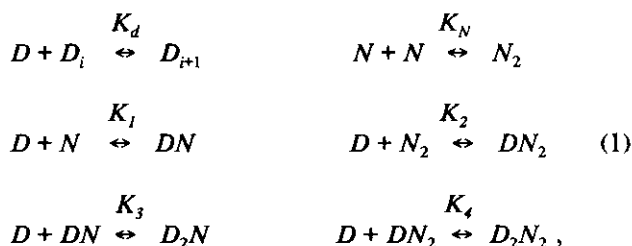
Рис. 1. Структурные формулы ароматических лигандов с указанием необмениваемых протонов: а — новантрон; б — кофеин

при изучении интеркалирующих лигандов бромистого этидия [29] и дауномицина [30, 31] с данным дезокситетрануклеотидом. Это прежде всего связано с особенностями проведения 2M-NOESY экспериментов для исследуемой молекулярной системы — при сравнительно высоких температурах (≥ 310 K) и довольно низких концентрациях антибиотика в смешанном растворе с дезоксиолигонуклеотидом, поскольку NOV является осадителем ДНК при комнатной температуре [6]. Можно предположить, что определенную роль в молекулярном взаимодействии играют и структурные особенности интеркалированного комплекса при встраивании антибиотика со стороны большой канавки двойной спирали [9, 10]. Следует также иметь в виду, что вследствие высокой константы самоассоциации новантрона ($K_{\text{NOV}} = 27300 \text{ M}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$ [26]) концентрация молекул антибиотика в агрегированном состоянии в растворе существенно больше, чем, например, молекул дауномицина ($K_{\text{DAU}} = 720 \text{ M}^{-1}$

[32]) и бромистого этидия ($K_{\text{EB}} = 305 \text{ M}^{-1}$ [33]) при тех же экспериментальных условиях.

Количественную оценку взаимодействия новантрона с дезокситетрануклеотидом проводили на основе анализа экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов молекулы антибиотика при различных температурах (рис. 2, а). Однако в отличие от ранее проведенных исследований [29—31] ввиду высокой константы реакции самоассоциации молекул антибиотика в схему динамического равновесия в растворе включены реакции бесконечномерной ассоциации молекул NOV [26]. Исследования самоассоциации молекул NOV, проведенные в аналогичных экспериментальных условиях [26], однозначно указывают на существенный вклад агрегатов более высокого порядка, чем димеры, в общее равновесие в растворе.

Общая схема взаимодействия молекул включает следующие равновесные реакции в растворе:



где D и N — концентрация мономеров антибиотика и тетрануклеотида соответственно. При расчетах с использованием этой схемы закон сохранения массы для лиганда и тетрамера имеет вид:

$$\begin{aligned}
 &2K_N N^2(1 + K_2 D + K_2 K_4 D^2) \\
 &+ N(1 + K_1 D + K_1 K_3 D^2) - N_0 = 0; \quad (2) \\
 &2D^2(K_1 K_3 N + K_2 K_4 K_N N^2) + \\
 &+ D \left(\frac{1}{(1 - K_d D)^2} + K_1 N + K_2 K_N N^2 \right) - D_0 = 0.
 \end{aligned}$$

Тогда химический сдвиг протонов молекулы NOV может быть представлен следующим образом:

$$\begin{aligned}
 \delta = &\frac{D}{D_0(1 - K_d D)} \left[2\delta_m - 2\delta_d + \frac{2\delta_d - 2\delta_m}{1 - K_d D} \right] + \\
 &+ \frac{D}{D_0} (K_1 N \delta_1 + K_2 K_N N^2 \delta_2 + \\
 &+ 2K_1 K_3 D N \delta_3 + 2K_2 K_4 K_N D N^2 \delta_4). \quad (3)
 \end{aligned}$$

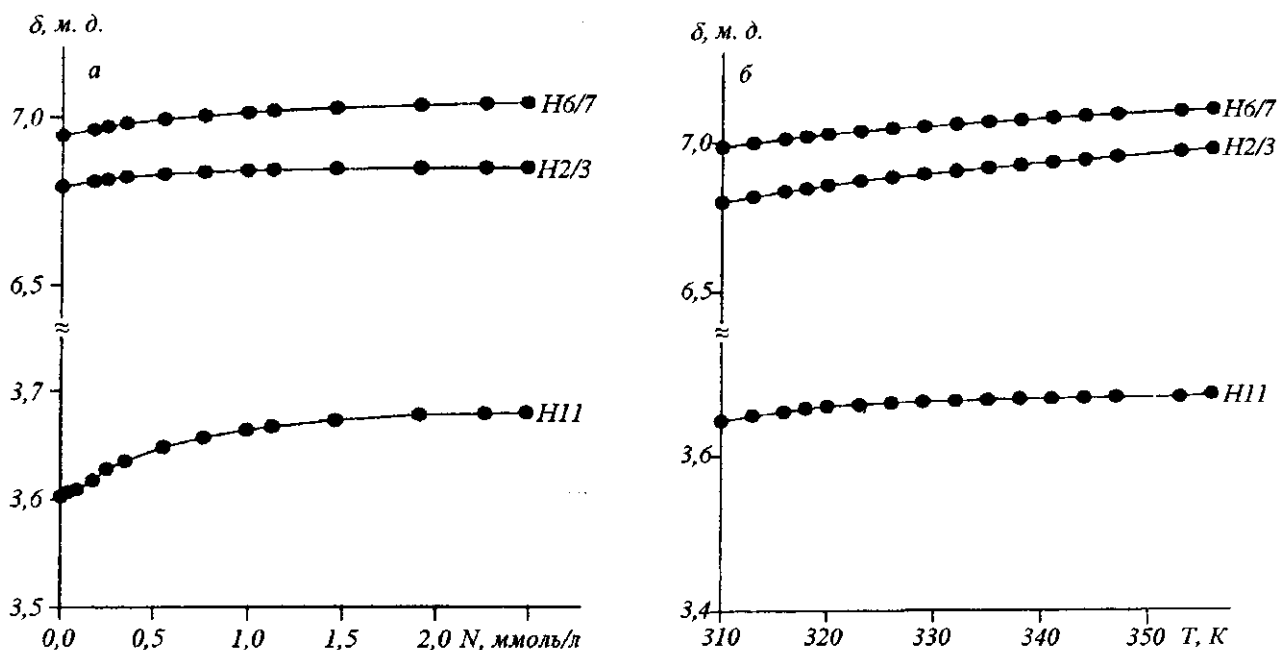


Рис. 2. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов новантрона в смешанном растворе: а — от концентрации тетрауклеотида ($D_0 = 0,5$ ммоль/л) при $T = 318$ К; б — от температуры ($D_0 = 0,5$ ммоль/л, $N_0 = 1,13$ ммоль/л)

Минимизацию функционала невязки, как и ранее [11, 29], проводили по восьми параметрам: $\delta_1 - \delta_4$ — предельные значения химических сдвигов протонов антибиотика в составе 1:1, 1:2, 2:1 и 2:2 комплексов; $K_1 - K_4$ — равновесные константы образования соответствующих типов комплексов. По условиям эксперимента, константа самоассоциации новантрона K_0 принята равной 22000 и 12400 M^{-1} при $T_1 = 308$ и $T_2 = 318$ К соответственно [26].

Детальное описание вычислительной процедуры нахождения параметров изложено в предыдущих работах [11, 29]. Отметим, что рассматриваемая модель (3) предполагает достаточно быстрый обмен в равновесных реакциях комплексообразования. Проведенные в настоящей работе ЯМР эксперименты свидетельствуют об отсутствии существенного уширения резонансных сигналов протонов во всем исследованном диапазоне концентраций и температур. Это подтверждает допустимость использования аддитивной модели при описании зависимости наблюдаемых протонных химических сдвигов от концентрации и температуры.

Полученные в результате расчетов значения предельных химических сдвигов протонов антибиотика $\delta_1 - \delta_4$ и равновесных констант $K_1 - K_4$ представлены в табл. 1. Здесь же приведены значения химических сдвигов исследуемых протонов NOV

внутри агрегата δ_i . Обращает на себя внимание тот факт, что во всех случаях $\delta_i < \delta_j$, $j = 1 \div 4$, т. е. экранирование ароматических протонов NOV в комплексах с ДНК меньше, чем внутри агрегата (самоассоциата), состоящего только из молекул NOV. Последнее позволяет объяснить наблюдаемый ход экспериментальных зависимостей протонных химических сдвигов молекул NOV в смешанном растворе с дезокситетрануклеотидом от концентрации, т. е. смещение экспериментальных кривых в область слабого поля при увеличении концентрации тетрамера (рис. 2, а), связанное с комплексообразованием молекул антибиотика с ДНК, что сопровождается уменьшением эффективного экранирования его протонов. Отметим, что в системах, исследованных ранее [11, 29–31, 34], экранирование внутри самоассоциатов было больше или близким к величине экранирования протонов интеркалятора в составе комплекса с ДНК, что приводило к противоположному характеру изменения экспериментальных концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов лиганда по сравнению с наблюдаемым в настоящей работе.

Из табл. 1 видно, что константы связывания NOV с дуплексом тетрамера первой (K_2) и второй (K_4) молекул антибиотика совпадают по порядку величины и существенно превышают константы K_1

Таблица 1

Расчетные значения химических сдвигов (δ_j , м. д.), равновесных констант реакций (K_j , л/моль) и термодинамических параметров (ΔG_j , кДж/моль; ΔH_j , кДж/моль; ΔS_j , Дж/моль·К) образования комплексов новантрона с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рD 7,1

Комплекс	j	δ_j (H2/3)	δ_j (H6/7)	δ_j (H11)	$K_j \cdot 10^3$	$-\Delta G_j(308)$	$-\Delta H_j$	$-\Delta S_j(308)$
$T = 308 \text{ K}$								
1:1	1	6,91	7,16	3,55	35±8	26,8±0,6	49±11	73±20
1:2	2	6,80	6,99	3,73	550±110	33,8±0,5	76±20	136±45
2:1	3	6,53	6,74	3,65	21±9	25,5±1,2	37±8	37±17
2:2	4	6,79	6,94	3,78	265±50	32,0±0,5	55±20	75±35
$T = 318 \text{ K}$								
1:1	1	6,86	7,14	3,56	27±6	—	—	—
1:2	2	6,85	7,04	3,76	360±70	—	—	—
2:1	3	6,60	6,75	3,66	16±4	—	—	—
2:2	4	6,85	6,93	3,79	180±30	—	—	—
δ_j	—	6,51	6,68	3,41	—	—	—	—

и K_3 связывания с одонитчатой ДНК. Этот факт с учетом ранее полученных результатов по связыванию различных интеркалирующих лигандов с d(TGCA)₂ [29, 30, 34] и предположения о комплексеобразовании молекул, согласно модели «исключенного соседа» [35], позволяет сделать вывод о преимущественном связывании антибиотика с пиримидин-пуриновыми сайтами d(TG) и d(CA) двухспиральной последовательности дезокситетрануклеотида. Данный вывод находится в хорошем согласии с результатами теоретического моделирования интеркаляции NOV в дуплекс тетрамеров различных последовательностей оснований в цепи [9].

Следует отметить, что в отличие от сравнительно простых интеркаляторов — ароматических красителей профлавина и бромистого этидия, хромофоры которых не содержат массивных боковых привесков [29, 34], наличие в структуре антибиотика дауномицина массивного аминокислотного кольца приводит к частичному блокированию третьей пары оснований и ярко выраженному антикооперативному процессу встраивания второй молекулы в дуплекс [30]. Качественно одинаковый характер равновесных констант комплексобразования NOV и ароматических красителей [29, 34] с d(TGCA) позволяет предположить, что влияние массивных аминокислотных цепей в положениях 5 и 8 хромофора молекулы NOV на третью пару

оснований незначительно. Можно также предположить, что именно боковые цепи ответственны за высокое сродство NOV к тетра-нуклеотиду: из всех исследованных ранее ароматических лигандов [29, 30, 34] константа K_2 интеркаляции молекул в дуплекс d(TGCA) для новантрона имеет наибольшее значение. Детальный теоретический анализ связывания NOV с дезокситетрануклеотидными последовательностями [9, 36] позволяет сделать заключение о том, что интеркаляция антибиотика NOV со стороны большой канавки стабилизируется как электростатическими взаимодействиями, так и специфическими водородными связями между NH₂- и OH-группами боковых цепей NOV и N7 — пуринов и кислородами сахарофосфатного остова олигонуклеотидов.

Следует отметить, что молекула NOV симметрична относительно плоскости, перпендикулярной плоскости хромофора и проходящей через центры ароматических колец, поэтому резонансы протонов H2 и H3, H6 и H7, а также боковых аминокислотных цепей в такой молекуле совпадают. Это приводит к неоднозначности определения структур интеркалированных комплексов NOV с d(TGCA), так как фактически только два резонансных сигнала (H2/H3 и H6/H7) хромофора антибиотика могут быть использованы для структурного анализа по описанной ранее методике [11, 29]. В связи с этим для рассматриваемой системы не могли быть

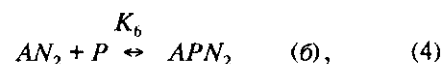
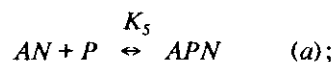
выполнены достаточно корректные расчеты структур 1:2 и 2:2 комплексов NOV с дезокситетрануклеотидом, в отличие от взаимодействия с d(TGCA) других интеркалирующих лигандов — бромистого этидия и дауномицина [29, 30].

Термодинамические параметры реакций взаимодействия новантрона с 5'-d(TGCA) определены, как и ранее [30, 34, 37], на основе экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов протонов NOV в растворе с тетрануклеотидом 5'-d(TGCA) (рис. 2, б) и аддитивной модели для наблюдаемого протонного химического сдвига антибиотика при различных температурах. Величины энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) рассчитывали с использованием формализма Вант-Гоффа [30, 34, 37]. Полученные значения энтальпии и энтропии реакций новантрона с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) в растворе приведены в табл. 1. Довольно высокие погрешности определения ΔH и ΔS образования комплексов NOV с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) (табл. 1) связаны с указанными выше особенностями исследуемой системы: использование сравнительно небольшого интервала изменения температуры и лишь трех протонов для определения термодинамических параметров по экспериментальным температурным зависимостям протонных химических сдвигов (рис. 2, б). Из данных этой таблицы видно, что ΔH реакций комплексообразования имеют достаточно большие отрицательные значения. Как известно, экзотермические реакции характерны для процессов агрегации, включающих в себя стэкинг-взаимодействие ароматических систем с делокализованными π -электронами [38, 39]. Установлено, что дисперсионное взаимодействие характеризуется как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [40]. Вместе с тем, согласно результатам теоретических расчетов [9, 36], между аминокильными цепями антибиотика и соседними основаниями в интеркалированном комплексе может образовываться до четырех водородных связей на цепь. По имеющимся в литературе данным, энтальпия образования Н-связи в водной среде принимает значения от -8 до -13 кДж/моль [41]. При возникновении Н-связи следует ожидать также и отрицательного изменения энтропии [41]. Следовательно, можно считать, что основной вклад в отрицательные значения термодинамических параметров комплексообразования NOV с дезокситетрануклеотидом вносят межмолекулярные водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса.

В случае коротких олигонуклеотидов, когда в растворе имеется сложное равновесие молекулярных ассоциатов, влияние тех или иных сил при

формировании комплексов с одно- и двухцепочечными последовательностями может быть существенно различным. Исследованные ранее системы интеркалирующих лигандов с 5'-d(TGCA) [30, 37] характеризовались наименьшими по абсолютной величине значениями энтропии и энтальпии при образовании 1:2 комплекса по сравнению с другими типами комплексов, что объяснялось значительными гидрофобными взаимодействиями, вносящими положительный энтропийный вклад при образовании комплекса. В случае интеркаляции NOV в дуплекс тетрамера комплекс 1:2 в сравнении с 1:1, 2:1 и 2:2 комплексами характеризуется наибольшим значением энтальпии и высоким значением энтропии. По-видимому, это связано с формированием специфических водородных связей между боковыми цепями NOV и нитями дуплекса при размещении цепей антибиотика в большой канавке ДНК [9, 10]. Отметим при этом, что в комплексах 1:2 и 2:2 NOV с дезокситетрануклеотидом достаточно весомый вклад в отрицательное значение ΔS может дать возрастание жесткости двухспиральной структуры при встраивании молекулы антибиотика [43]. Энтропия в этом случае уменьшается вследствие ограничения возможных конформационных состояний молекул [42].

Расчет относительного содержания комплексов «ДНК—новантрон» в присутствии кофеина в растворе. Знание равновесных констант само- и гетероассоциации кофеина и новантрона (табл. 2), а также их комплексообразования с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) (табл. 1) в одинаковых экспериментальных условиях позволяет рассчитать относительное содержание комплексов антибиотика с тетрануклеотидом при добавлении кофеина в раствор и тем самым сделать заключение о молекулярном механизме действия кофеина на эффективность интеркаляционного связывания ароматического антибиотика NOV с ДНК в водном растворе. В расчетной схеме наряду с рассмотренными выше реакциями гетероассоциации (1) самоассоциации CAF и NOV и их комплексообразования с дезокситетрануклеотидом были также учтены реакции образования гетерокомплексов CAF и NOV с мономером и дуплексом тетрануклеотида [44, 45]:



где A , P , N — концентрации NOV, CAF и тетра-

Таблица 2

Параметры само- и гетероассоциации новантрона и кофеина в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рD 7,1, T = 298 K*

Препарат	K, л/моль	$-\Delta G_{298}^0$, кДж/моль	$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S_{298}^0$, Дж/(моль · К)
Самоассоциация				
CAF	11,8±0,3	6,10±0,07	21,0±0,4	49,8±1,1
NOV	(27,3±8,6) · 10 ³	25,3±0,3	31,1±2,4	19,4±5,4
Гетероассоциация				
CAF + NOV	324±39	14,3±0,3	9,3±0,8	-(16,8±4,2)

П р и м е ч а н и е. *Данные взяты из работ [26, 44]. Анализ самоассоциации NOV и CAF проводили по бесконечномерной некооперативной модели [33]. Для расчета параметров гетероассоциации молекул использовали статистико-термодинамическую модель, описанную в работах [24, 25].

нуклеотида соответственно. При этом равновесные константы K_5 и K_6 связывания CAF с 1:1 (AN) комплексом NOV + d(TGCA) и с 1:2 (AN₂) комплексом NOV + d(TGCA)₂ полагают соответственно равными константам K_3 и K_4 в схеме (5). Такое предположение представляется оправданным, поскольку, как обсуждалось выше, влияние боковых цепей молекулы NOV на третью пару оснований олигонуклеотида несущественно. Следовательно, можно считать, что связывание антибиотика с ДНК отвечает модели «исключенного соседа» [35], согласно которой интеркаляция молекулы между соседними парами оснований маловероятна и соответственно взаимное влияние друг на друга антибиотиков при их интеркаляционном встраивании в олигонуклеотидную последовательность незначительно. Вычислительная процедура относительного содержания комплексов различного вида предусматривает определение равновесных концентраций P, A и N путем решения системы нелинейных уравнений, составленных с учетом законов действующих масс для реакций (1) и (4) и закона сохранения массы [44, 45].

На рис. 3 представлены расчетные кривые, показывающие относительное уменьшение (F_d) содержания комплексов NOV с дуплексом дезокситетрануклеотида 5'-d(TrGrCpA)₂ в зависимости от концентрации тетрануклеотида (r_N) при добавлении в раствор кофеина в различных концентрациях (r_P). Прежде всего необходимо отметить, что все расчетные кривые практически выходят на насыщение при $r_N > 2$, то есть когда концентрация дуплекса тетрануклеотида превышает содержание антибиотика в растворе. При этом степень насыщения кривых существенно зависит от концентрации

кофеина в растворе. Возрастание F_d в области $r_N < 2$ связано с существенным вкладом гетероассоциации NOV и CAF при этих условиях (рис. 4, б) в процессе комплексообразования антибиотика с олигонуклеотидом. Подобный анализ позволяет, в принципе, для каждого ароматического биологически активного вещества подобрать оптимальную концентрацию CAF, обеспечивающую определенное снижение эффективного связывания антибиотика с ДНК. Например, при $r_P = 50$ наблюдается относительное уменьшение содержания комплексов NOV с d(TGCA)₂ на ~30 %, а при относительной концентрации кофеина $r_P = 75$ — на 50 %, то есть при этом эффективность действия интеркалятора на ДНК составляет 50 %.

Как уже отмечалось, в работах [21—23] сделано предположение, что кофеин выступает перехватчиком — интерцептором веществ, интеркалирующих в ДНК, поэтому в присутствии CAF уменьшается эффективная концентрация свободного антибиотика в растворе и, как следствие, его фармакологическая активность. Проведенные нами расчеты позволяют проверить правомерность данного предположения. На рис. 4, а, представлены расчетные зависимости относительного содержания гетерокомплексов APN и APN₂ от концентрации кофеина в растворе при различных отношениях концентраций тетрануклеотида и антибиотика (r_N). Видно, что удельный вес таких комплексов возрастает с повышением концентрации кофеина, то есть CAF блокирует места посадки антибиотика NOV на дезокситетрануклеотиде. Чтобы выяснить, какой из процессов является преобладающим при воздействии CAF на степень связывания интеркалирующего антибиотика с ДНК — блокировка мест

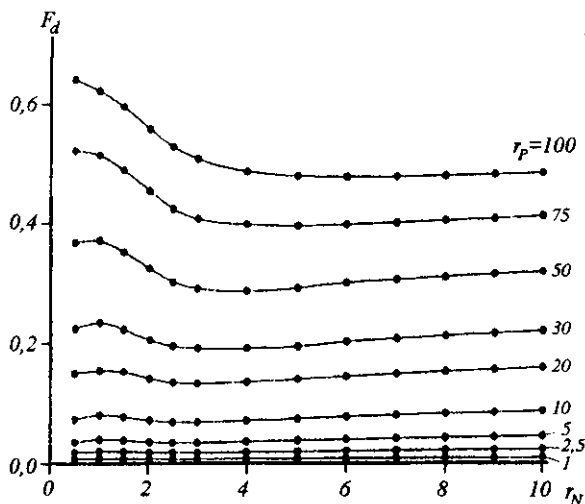


Рис. 3. Относительное содержание F_d комплексов новантрона с $5'$ -d(TrGpCpA)₂ в зависимости от отношения концентрации дезокситетрануклеотида и антибиотика, r_N ($r_N = [N_0]/[A_0]$), при различных относительных концентрациях кофеина, r_p ($r_p = [P_0]/[A_0]$), в растворе при $T = 298$ К

посадки на олигонуклеотиде или образование гетерокомплекса «CAF—антибиотик» непосредственно в растворе, было рассчитано содержание гетерокомплексов «CAF—NOV» по отношению к комплексам кофеина с дезокситетрануклеотидом при различных значениях r_N как функции отношения концентраций CAF и NOV (r_p) в смешанном растворе (рис. 4, б). Из рис. 4, б, видно, что даже при максимальной исследованной относительной концентрации кофеина $r_p = 100$ вклад гетерокомплекса «CAF—NOV» в снижение эффективности связывания антибиотика NOV с тетрауклеотидом составляет не больше 50 % при $r_N = 3$, а при возрастании r_N он становится еще меньшим. Безусловно, для других антибиотиков этот вклад может быть иным, что определяется отношением концентраций олигонуклеотида и антибиотика (r_N), а также соотношением равновесных констант образования молекулярных ассоциатов в растворе и, в первую очередь, равновесной константой гетероассоциации CAF с интеркалирующим антибиотиком [44, 45].

Выражаем благодарность Объединенному центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр 500 МГц. Работа частично финансировалась Международной программой INTAS (грант INTAS-97-31753).

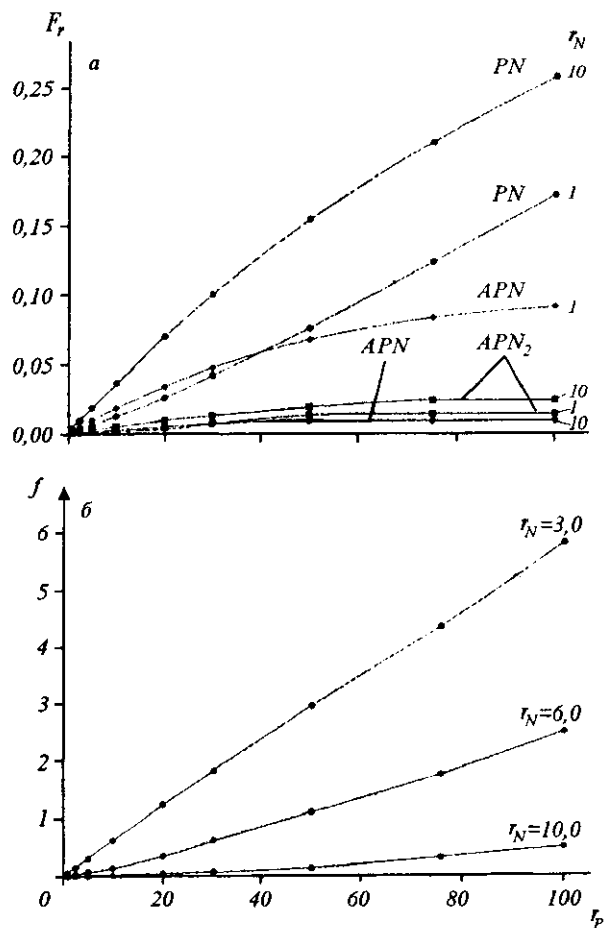


Рис. 4. Расчетные зависимости: а — относительного содержания (F_r) комплексов кофеина (P) и новантрона (A) с тетрауклеотидом (N) $5'$ -d(TrGpCpA); б — содержания гетерокомплексов CAF—NOV по отношению к суммарному содержанию комплексов CAF с тетрауклеотидом (f) как функции отношения концентраций кофеина и антибиотика, r_p ($r_p = [P_0]/[A_0]$), в смешанном растворе, $T = 298$ К

A. N. Veselkov, S. A. Vysotsky, M. P. Evstigneev, D. A. Veselkov, L. N. Djimant, P. A. Bolotin, D. B. Davies

¹H-NMR analysis of the interaction of antibiotic mitoxantrone with DNA in the presence of caffeine in aqueous solution

Summary

The complexation of antitumour antibiotic novantrone (NOV) with DNA in the presence of caffeine (CAF) in aqueous solution has been studied by 1D and 2D 500 MHz ¹H-NMR spectroscopy. The molecule complexation has been analysed considering thermodynamical parameters of the reactions of self-association and hetero-association of NOV and CAF and their interaction with

deoxytetranucleotide 5'-d(TpGpCpA) under the same experimental conditions. It is concluded that novatrone intercalates preferentially into pyrimidine-purine sequence of the oligonucleotide studied. It is shown that the decrease in complexation of NOV with DNA in the presence of CAF in solution is mainly due to «blockage» of the binding sites by the caffeine molecules.

О. Н. Веселков, С. О. Висоцький, М. П. Євстигнєєв,
Д. О. Веселков, Л. Н. Димант, П. О. Болотін, Д. Б. Деєв

Аналіз взаємодії антибіотика мітоксантрону з ДНК у присутності кофеїну у водному розчині за даними ¹H-ЯМР спектроскопії

Резюме

Методом одно- і двовимірної ¹H-ЯМР спектроскопії (500 МГц) вивчено зв'язування протипухлинного антибіотика мітоксантрону, або новантрону (NOV), з ДНК у присутності кофеїну (CAF) у водному розчині. Комплексоутворення молекул проаналізовано з урахуванням термодинамічних параметрів реакцій само- і гетероасоціації NOV і CAF та взаємодії лігандів з дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpCpGpA) за однакових експериментальних умов. Зроблено висновок про сиквенс-специфічність зв'язування NOV з піримідин-пуриновими послідовностями досліджуваного олігонуклеотиду. Показано, що зниження ефективності NOV, інтеркалюючого в ДНК при додаванні до розчину CAF, у значній мірі пов'язано з блокуванням молекулами кофеїну місць посадки на олігонуклеотидній послідовності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Cotter F. E. Therapeutic milestones. Novatrone (mitoxantrone) // Brit. J. Clin. Pract.—1988.—42.—P. 207—209.
- Drewinko B., Yang L.-Y., Barlogie B., Trujillo J. M. Comparative cytotoxicity of bisantrene, mitoxantrone, ametantrone, dehydroxyanthracenedione diacetate, and doxorubicin on human cells *in vitro* // Cancer Res.—1983.—43.—P. 2648—2653.
- Feofanov A., Sharonov S., Kudelina I., Fleury F., Nabiev I. Localization and molecular interactions of mitoxantrone within living K562 cells as probed by control spectral imaging analysis // Biophys. J.—1997.—73.—P. 3317—3327.
- Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z. Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs ametantrone and mitoxantrone (Novatrone) and their ability to condense nucleic acids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83.—P. 6302—6306.
- Smith P. J., Morgan S. A., Fox M. E., Watson J. V. Mitoxantrone-DNA binding and the induction of topoisomerase II associated DNA damage in multi-drug resistant small cell lung cancer cells // Biochem. Pharm.—1990.—40.—P. 2069—2078.
- Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z. Interactions of antitumor agents ametantrone and mitoxantrone (novatrone) with double-stranded DNA // Biochem. Pharm.—1985.—34.—P. 4203—4213.
- Bailly C., Routier S., Bernier J.-L., Waring M. J. DNA recognition by two mitoxantrone analogues: influence of the hydroxyl groups // FEBS Lett.—1996.—379.—P. 269—272.
- Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z., Traganos F., Melamed M. Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids // Biochem. Pharm.—1981.—30.—P. 231—240.
- Chen K.-X., Gresh N., Pullman B. A theoretical investigation on the sequence selective binding of mitoxantrone to double-stranded tetranucleotides // Nucl. Acids Res.—1986.—14.—P. 3779—3812.
- Lown J. W., Morgan A. R., Yen S. F., Wang Y.-H., Wilson W. D. ¹H-NMR analysis of the intercalation complex of mitoxantrone with the oligonucleotide duplex d(CpGpCpG)₂ // Biochemistry.—1985.—24.—P. 4028—4035.
- Davies D. B., Veselkov A. N. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ¹H-NMR spectroscopy // J. Chem. Soc. Faraday Trans.—1996.—92.—P. 3545—3557.
- Машковський М. Д. Лекарственные средства.—М.: Медицина, 1985.—Т. 2.—С. 107.
- Beetham K. L., Busse P. M., Tolmach L. J. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. V. Identity of the sector of cells that express potentially lethal damage in G₁ and G₂ // J. Cell Physiol.—1983.—115.—P. 283—289.
- Selby C. P., Sancar A. Molecular mechanism of DNA repair inhibition by caffeine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87.—P. 3522—3525.
- Witte W., Bohme H. The action of caffeine on the survival of *Proteus mirabilis* and its virulent phage vir after UV-irradiation and treatment with nitrogen mustard // Mut. Res.—1972.—16.—P. 133—139.
- Fritzshe H., Petri J., Schutz H., Weller K., Sedrema P., Lang H. On the interaction of caffeine with nucleic acids. III. ¹H-NMR studies of caffeine-5'-adenosine monophosphate and caffeine-poly(riboadenylate) interactions // Biophys. Chem.—1980.—11.—P. 109—119.
- Kimura H., Aoyama T. Decrease in sensitivity to ethidium bromide by caffeine, dimethylsulfoxide or 3-aminobenzamide due to reduced permeability // J. Pharmacobiodyn.—1989.—12.—P. 589—595.
- Ross W. E., Zwelling L. A., Kohn K. W. Relation between cytotoxicity and DNA strand breakage produced by adriamycin and other intercalating agents // Int. J. Radiat. Biol. Phys.—1979.—5.—P. 1221—1224.
- Ganapathi R., Grabowski D., Schmidt H., Yen A., Iliakis G. Modulation of adriamycin and N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate induced effects on cell cycle traverse and cytotoxicity in P388 mouse leukemia cells by caffeine and the calmodulin inhibitor trifluoperazine // Cancer Res.—1979.—46.—P. 5553—5557.
- Iliakis G., Nusse M., Ganapathi R., Egner J., Yen A. Differential reduction by caffeine of adriamycin induced cell killing and cell cycle delay in Chinese V79 cell // Int. J. Radiat. Biol. Phys.—1986.—12.—P. 1987—1995.
- Traganos F., Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs *in vitro*: A flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with Novatrone, Doxorubicin, Ellipticine, and the Doxorubicin analogue AD198 // Cancer Res.—1991.—51.—P. 3682—3689.
- Larsen R. W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P. T., Andrada V. G., Jameson D. M. Spectroscopic and molecular modelling studies of caffeine complexes with DNA intercalators // Biophys. J.—1996.—70.—P. 443—452.
- Kapuscinsky J., Kimmel M. Thermodynamical model of mixed aggregation of intercalators with caffeine in aqueous solution // Biophys. Chem.—1993.—46.—P. 153—163.
- Davies D. B., Veselkov D. A., Veselkov A. N. Structure and thermodynamics of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution determined by NMR spectroscopy // Mol. Phys.—1999.—97.—P. 439—451.
- Davies D. B., Veselkov D. A., Kodintsev V. V., Evstigneev M. P., Veselkov A. N. ¹H NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: factors involved

- in the stabilization of complexes of daunomycin and acridine drugs // *Mol. Phys.*—2000.—98.—P. 1961—1971.
26. *Davies D. B., Veselkov D. A., Evstigneev M. P., Veselkov A. N.* Self-association of the antitumour agent Novantrone (Mitoxantrone) and its hetero-association with caffeine // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.*—2001.—P. 61—67.
 27. *Lilley T. H., Linsdell H., Maestre A.* Association of caffeine in water and aqueous solutions of sucrose // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1992.—88.—P. 2865—2870.
 28. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Кодицев В. В., Люсютин В. А., Паркес Х., Дэвис Д. Б.* Исследование самоассоциации молекул дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов d(TrGpCpA) в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // *Биофизика.*—1995.—40.—С. 283—292.
 29. *Davies D. B., Karawajew L., Veselkov A. N.* ^1H -NMR structural analysis of ethidium bromide complexation with self-complementary deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(TrGpCpA) in aqueous solution // *Biopolymers.*—1996.—38.—P. 745—757.
 30. *Davies D. B., Eaton R. J., Baranovsky S. F., Veselkov A. N.* NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution // *J. Biomol. Struct. Dyn.*—2000.—17.—P. 887—901.
 31. *Итон Р. Дж., Барановский С. Ф., Веселков Д. А., Осетров С. Г., Болотин П. А., Дымант Л. Н., Пахомов В. И., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н.* Исследование комплексообразования дауномицина с дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // *Биофизика.*—2000.—45.—С. 586—599.
 32. *Итон Р. Дж., Веселков Д. А., Барановский С. Ф., Осетров С. Г., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н.* Исследование самоассоциации антрациклиновых антибиотиков дауномицина и ногамицина в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // *Хим. физика.*—2000.—19.—С. 98—104.
 33. *Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.* ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 383—390.
 34. *Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N.* ^1H NMR structural analysis of the interaction of proflavine with self-complementary deoxytetranucleotides of different base sequence // *Nucleotides and Nucleosides.*—1994.—13.—P. 657—671.
 35. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*—1974.—86.—P. 463—489.
 36. *Pullman B.* Molecular mechanism of specificity in DNA-antitumor drug interactions // *Adv. Drug Res.*—1989.—18.—P. 1—112.
 37. *Davies D. B., Djimant L. N., Baranovsky S. F., Veselkov A. N.* ^1H -NMR determination of the thermodynamics of drug complexation with single-stranded and double-stranded oligonucleotides in solution: ethidium bromide complexation with the deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT), and 5'-d(TrGpCpA) // *Biopolymers.*—1997.—42.—P. 285—295.
 38. *Chaires J. B.* Thermodynamics of the daunomycin-DNA interaction: Ionic strength dependence of the enthalpy and entropy // *Biopolymers.*—1985.—24.—P. 403—419.
 39. *Delbarre A., Roques B. P., Le Pecq J. B., Lallemand J. Y., Nguyen-Dat-Xuong.* PMR studies of the self-association of DNA intercalating ellipticine derivatives in aqueous solution // *Biophys. Chem.*—1976.—4.—P. 275—279.
 40. *Ross P. D., Subramanian S.* Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability // *Biochemistry.*—1981.—20.—P. 3096—3102.
 41. *Marky L., Blumenfeld K. S., Breslauer K. J.* Calorimetric and spectroscopic investigation of drug-DNA interaction. Binding of netropsin to poly d(AT) // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11.—P. 2857—2870.
 42. *Sturtevant J. M.* Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 2236—2240.
 43. *Reinert K. E.* Anthracycline binding induced DNA stiffening, bending and elongation. Stereochemical implications from viscometric investigation // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11.—P. 3411—3430.
 44. *Веселков Д. А., Дэвис Д. Б., Дымант Л. Н., Веселков А. Н.* Молекулярный механизм протекторного действия кофеина при комплексообразовании интеркалирующего лиганда с ДНК // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 6.—С. 468—481.
 45. *Davies D. B., Veselkov D. A., Djimant L. N., Veselkov A. N.* Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer // *Eur. Biophys. J.*—2001.—30.—P. 354—366.

УДК 577.113

Надійшла до редакції 25.12.2000