

УДК 537.323.2

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ ПРОТИВОИОНОВ В РАСТВОРЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОКСАЗОНА, КСАНТОНА И КАРБАЗОЛА, СОДЕРЖАЩИХ БЕНЗО-КРАУН-ГРУППИРОВКИ© 2009 **Е.Б. Морошкина^{1*}, А.А. Богданов¹, М.О. Колонистова¹, О.Б. Седова², Т.А. Урусова¹**¹Санкт-Петербургский государственный университет²Костромской государственный университет им. Н.А. Некрасова

Статья поступила 21 июня 2008 г.

Методами спектрофотометрии, кругового дихроизма, вискозиметрии и динамического двойного лучепреломления исследовано взаимодействие молекулы ДНК с производными феноксазона, ксантона и карбазола, содержащими радикалы (бензо-18-краун-6)-4'-ил и (бензо-15-краун-5)-4'-ил, связанных с хромофором через спейсеры различной протяженности, в присутствии ионов Na^+ и K^+ . Определены термодинамические параметры связывания исследованных соединений с ДНК, а также изменения в макромолекулярных параметрах молекулы ДНК при комплексообразовании. На основании полученных результатов предложены модели связывания этих соединений с двойной спиралью ДНК. Показано, что способ связывания с ДНК производного феноксазона, содержащего два радикала (бензо-15-краун-5)-4'-ил, связанных с хромофором через фрагмент глицина, зависит от типа противоиона в растворе. В присутствии Na^+ хромофор интеркалирует в двойную спираль ДНК, а в присутствии K^+ связывается с ДНК в виде димера снаружи двойной спирали. На способ связывания с ДНК других краунсодержащих соединений актиноцина тип противоиона не оказывает влияния. В случае соединений, содержащих радикал (бензо-18-краун-6)-4'-ил, способ связывания с молекулой ДНК зависит только от длины спейсера.

Ключевые слова: ДНК, бензо-краунсодержащие производные феноксазона, ксантона и карбазола, спектрофотометрия, круговой дихроизм, вискозиметрия, оптическая анизотропия, взаимодействие, интеркаляция.

ВВЕДЕНИЕ

Противоопухолевая активность целого ряда соединений обусловлена их способностью взаимодействовать с молекулой ДНК, вызывая торможение ДНК-зависимого синтеза РНК. Одной из проблем создания эффективных противоопухолевых средств подобного рода является отсутствие у них специфичности к опухолевым клеткам. В связи с этим становится актуальным синтез препаратов, взаимодействие которых с молекулой ДНК зависит от внешних условий, различающихся в нормальных и опухолевых клетках, например, от ионного состава среды [1—3]. Наибольшую концентрацию в клетке имеют ионы K^+ и Na^+ . Эффективными комплексообразующими агентами катионов щелочных металлов являются краун-эфир. В зависимости от размера катиона могут образовываться комплексы различной стехиометрии. Комплексы 1:1 могут быть сформированы, если количество донорных атомов кислорода и размер полости кольца крауна соответствуют координационному числу и ионному радиусу щелочного катиона.

* E-mail: evmorosh@mail.ru

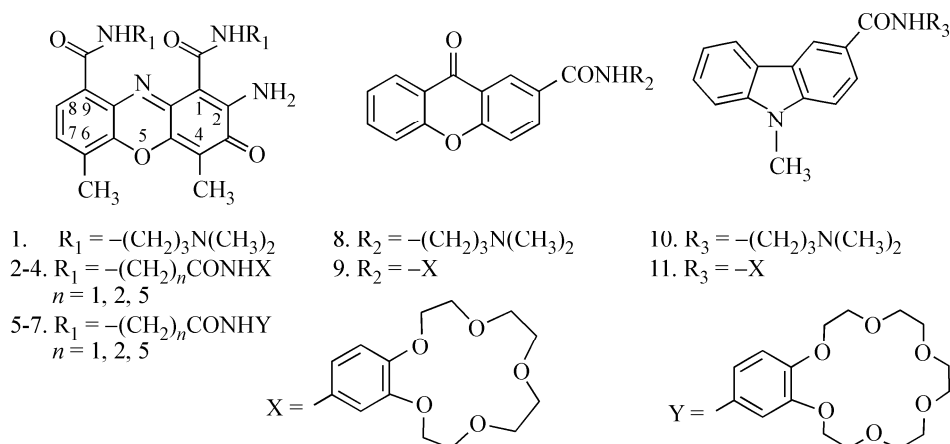


Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений

В том случае, когда диаметр катиона больше, чем полости кольца краун-эфира, две краун-группировки могут взаимодействовать с одним ионом металла, образуя комплекс типа "сэндвич", например, 2 (15-краун-5)/ K^+ [4, 5].

Синтез соединений, содержащих помимо группы, взаимодействующей с двойной спиралью ДНК, краун-группировки, селективные к различным катионам, является перспективным направлением создания новых биологически активных препаратов. Были синтезированы краун-содержащие производные различных интеркалирующих в двойную спираль ДНК соединений: феназина [6], метидиума и псоралена [7]. Фукуда с соотр. [8] продемонстрировали, что взаимодействие с ДНК производного акридина, содержащего фрагмент азкарауна, зависит от концентрации противоионов в среде.

В Санкт-Петербургском технологическом институте был синтезирован ряд производных феноксазона, ксантона и карбазола, содержащих краун-фрагменты, способные ассоциировать ионы Na^+ и K^+ , бензо(15-краун-5) и бензо(18-краун-6) [9, 10]. Синтезированные соединения обладают противоопухолевой активностью, величина которой зависит как от длины линкера, так и от размера полости краун-группировки [11].

Ранее было доказано, что ксантоновый [12] и феноксазоновый [13, 14] хромофоры, входящие в состав ряда соединений, обладающих противоопухолевой активностью, интеркалируют в двойную спираль ДНК. В то же время исследования взаимодействия с ДНК различных производных феноксазона показали, что его способность интеркалировать в двойную спираль ДНК зависит от природы заместителей в 1-м и 9-м положениях [15—17].

В настоящей работе методами спектрофотометрии, кругового дихроизма, вискозиметрии и динамического двойного лучепреломления проведено сравнительное исследование взаимодействия с молекулой ДНК производных феноксазона, содержащих два радикала (бензо-18-краун-6)-4'-ил или (бензо-15-краун-5)-4'-ил, связанных с хромофором через спейсеры различной протяженности, в присутствии ионов Na^+ и K^+ . В качестве спейсеров использованы фрагменты глицина, β -аланина и ε -аминокапроновой кислоты (рис. 1, соединения 2—7).

Взаимодействие с ДНК производных ксантона и карбазола, содержащих радикал (бензо-15-краун-5)-4'-ил (см. рис. 1, соединения 9 и 11), было исследовано методами спектрофотометрического и спектрополяриметрического титрования в присутствии интеркалирующего производного феноксазона (см. рис. 1, соединение 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали ДНК из тимуса теленка фирмы "Serva" с молекулярной массой $M = 10^7$ Да. Коэффициент экстинкции ДНК $\varepsilon_{259} = 6400\text{—}6700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Все исследуемые соединения были синтезированы на кафедре органической химии СПбГТИ. Синтез и характеристики краун-

содержащих соединений описаны ранее и отвечали литературным данным [9, 10]. Комплексы этих соединений с ДНК были получены в результате добавления к водно-солевому раствору ДНК раствора лиганда в этиловом спирте, насыщенном ионами Na^+ или K^+ . Соотношение объемов исходных растворов $V_{\text{лиганд}}/V_{\text{ДНК}}$ при приготовлении комплексов составляло не более 0,1. Ионная сила μ полученных растворов была равна 0,1 или 0,001 и в дальнейшем сохранялась при концентрационных измерениях.

Способ связывания соединений 2, 3, 5 и 6 с ДНК определяли на основании анализа изменений характеристической вязкости $[\eta]$ и оптической анизотропии $\alpha_1 - \alpha_2$ макромолекулы при комплексообразовании по методу, описанному ранее [18, 19]. Изменение оптической анизотропии при комплексообразовании находили методом динамического двойного лучепреломления, используя соотношение Петерлина [20] $\Delta n/g(\eta - \eta_0)$, пропорциональное $(\alpha_1 - \alpha_2)$, где Δn — величина двойного лучепреломления, определяемая с помощью экспериментальной оптической установки со слюдяным полутеневым эллиптическим компенсатором [21]; g — градиент скорости потока; η и η_0 — вязкость раствора и растворителя соответственно, измеряемые с помощью магнитного ротационного вискозиметра [22]. Количество связанного лиганда, приходящегося на пару азотистых оснований ДНК r , определяли из данных спектрофотометрического титрования (СФТ) [23].

Полосы поглощения соединений 9 и 11 перекрываются с длинноволновой полосой поглощения ДНК, что не позволяет использовать данную методику [18]. Поэтому способ связывания этих соединений с молекулой ДНК определяли по их влиянию на термодинамические параметры и способ связывания соединения 1. Для этого проводили СФТ соединений 9 и 11 растворами ДНК в присутствии соединения 1. Соотношение их концентраций сохраняли постоянным: $C_{9,11}/C_1 = 5$. Для обнаружения влияния краун-группировки на связывание с ДНК проводили титрование в тех же условиях производных ксантона и карбазола, у которых краун-группировки замещены радикалом $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (см. рис. 1, соединения 8, 10).

Константы связывания (k) и количество мест связывания на пару оснований n рассчитывали по методу Мак Ги и фон Хиппеля [24]. Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре Specord UV-Vis. Параллельно со спектрофотометрическим титрованием проводили спектрополяриметрическое титрование. Спектры индуцированного кругового дихроизма (ИКД) регистрировали с помощью дихрографа Jobin-Yvon Mark5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрическое титрование. При взаимодействии феноксазонового хромофора с ДНК при титровании растворов лиганда раствором ДНК происходят изменения в длинноволновой полосе поглощения хромофора: падение интенсивности и батохромное смещение максимума спектра. На рис. 2, а изображены кривые спектрофотометрического титрования соединения 1 в 0,1 М КСl. Наличие изобестической точки свидетельствует об одном способе связывания соединения 1 с ДНК в этих условиях. Аналогичные изменения в спектре поглощения различных производных феноксазона наблюдались ранее в 0,1 М NaCl [23] и в настоящей работе у соединений 3 и 6 при $\mu = 0,001$ в присутствии ионов K^+ и Na^+ , у соединения 2 в присутствии ионов Na^+ и у соединения 5 независимо от ионной силы среды и типа катиона. Кривые СФТ соединения 2 в 0,1 М КСl отличаются по форме (см. рис. 2, б). Рассчитанные параметры связывания этих соединений в разных ионных условиях приведены в табл. 1. У соединений 4 и 7, обладающих наиболее длинным спейсером, изменения спектров поглощения не наблюдаются, что свидетельствует об отсутствии связывания хромофора с макромолекулой.

Характер изменения кривых СФТ соединения 1 в присутствии соединений 8—11 не меняется. Однако рассчитанные термодинамические параметры связывания k и n изменяются в зависимости от природы хромофора дополнительного лиганда (табл. 2).

Построенные на основании данных СФТ зависимости величины r от концентрации соединения 1 в свободном состоянии (C) в присутствии соединений 8—11 также имеют разную форму (рис. 3). Наблюдаемые различия определяются только природой хромофора. Наличие бензо-

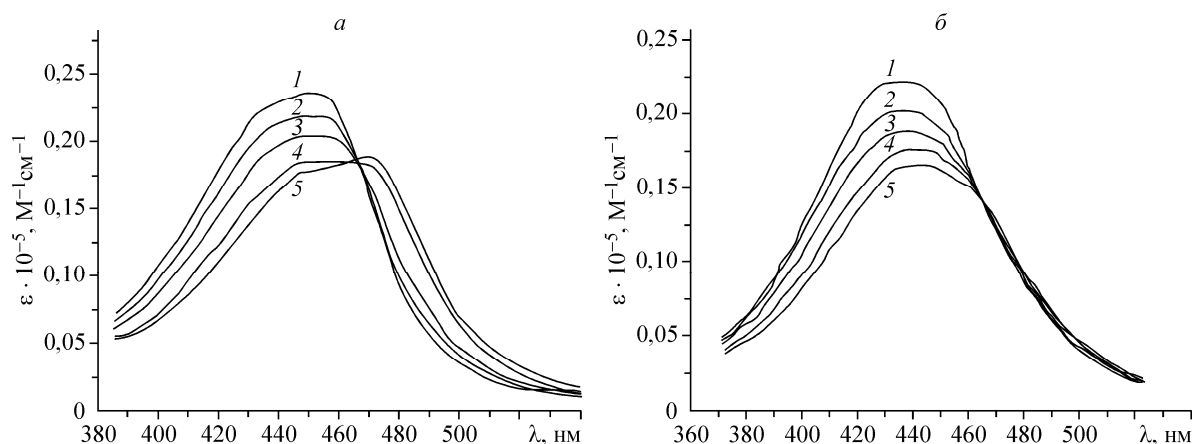


Рис. 2. Спектры поглощения производных актиноина в присутствии ДНК при различном соотношении молярных концентраций лиганда и ДНК (D/p) в 0,1 М КСl: *a* — соединение 1: $C_{\text{ДНК}} = 0$ (1), $D/p = 1,2$ (2), 0,5 (3), 0,3 (4), 0,1 (5); *б* — соединение 2: $C_{\text{ДНК}} = 0$ (1), $D/p = 1,0$ (2), 0,5 (3), 0,2 (4), 0,05 (5)

краун-группировки практически не влияет ни на параметры связывания, ни на форму кривой связывания.

Индукцированный круговой дихроизм. Все исследованные соединения оптически не активны. В присутствии ДНК у соединений 1—3, 5, 6 наблюдается ИКД, сопряженный с длинноволновой полосой поглощения хромофора. У соединений 4 и 7 ИКД отсутствует.

Появление ИКД, сопряженного с длинноволновой полосой поглощения, свидетельствует о взаимодействии соединения с ДНК и вызывается взаимодействием хромофоров лиганда с азотистыми основаниями ДНК и/или друг с другом [25]. Взаимодействие изолированного хромофора с азотистыми основаниями ДНК приводит к возникновению спектра ИКД в виде одиночной полосы, знак которой связан со взаимной ориентацией дипольных моментов взаимодействующих электронных переходов хромофора и пары азотистых оснований [26]. Взаимодействие хромо-

Т а б л и ц а 1

Термодинамические параметры связывания соединений 2—7 с ДНК

Соединение	0,1 М NaCl		0,001 М NaCl		0,1 М KCl		0,001 М KCl	
	$k \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	n	$k \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	n	$k \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	n	$k \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	n
2	4,2±0,2	0,2±0,05	5,7±0,2	0,10±0,02	4,5±0,2	0,3±0,1	1,3±0,1	0,2±0,02
3	—	—	—	—	—	—	1,2±0,1	0,2±0,05
5	8,4±0,4	0,3±0,05	≥100	≤0,5	12±1	0,4±0,1	≥100	≤0,5
6	—	—	0,4±0,05	0,10±0,02	—	—	5,4±0,2	0,3±0,05

Т а б л и ц а 2

Термодинамические параметры связывания соединения 1 в присутствии соединений 8—11

Соединение	0,1 М KCl		0,1 М NaCl	
	$k \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	n	$k \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	n
1	18±1	0,50±0,05	14±1	0,50±0,05
1+8	18±1	0,25±0,05	5±1	0,30±0,05
1+9	18±1	0,25±0,05	10±1	0,30±0,05
1+10	12±1	0,5±0,1	12±1	≥0,6
1+11	8±1	0,5±0,1	8±1	≥0,6

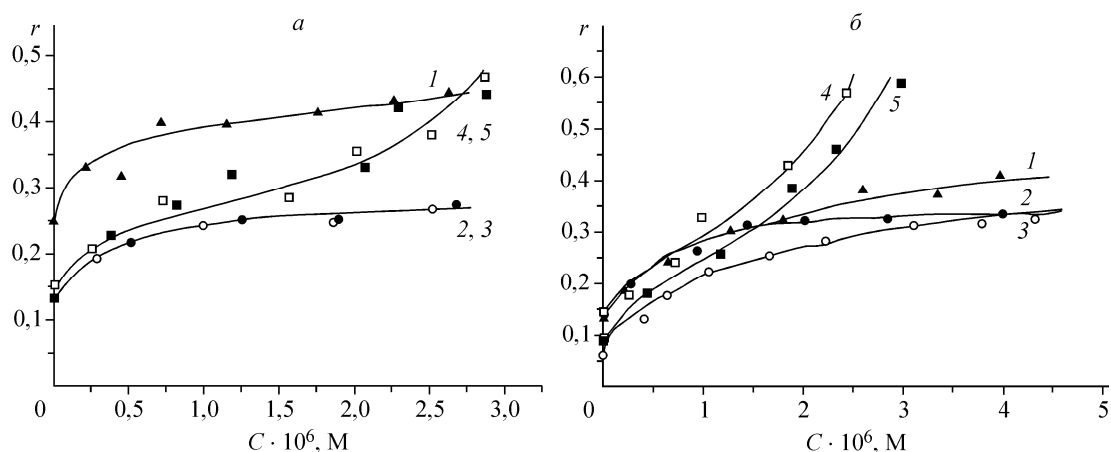


Рис. 3. Кривые связывания (зависимость r от C) соединения 1 (1) в присутствии соединений 2 (2), 3 (3), 4 (4), 5 (5): a — в 0,1 М КСl, b — в 0,1 М NaCl

форов связанных с ДНК молекул лиганда между собой приводит к образованию экситонного спектра ИКД в виде двойной полосы разных знаков равной интенсивности [27]. Наблюдаемые спектры ИКД соединения 1 в присутствии ионов K^+ (рис. 4, a), как и соединения 2 в присутствии ионов Na^+ , и соединения 5 в присутствии ионов Na^+ и K^+ , являются результатом наложения обоих эффектов. Увеличение концентрации ДНК приводит к уменьшению интенсивности экситонной составляющей, вызванному уменьшением взаимодействия между ближайшими связанными молекулами лиганда. Спектр ИКД соединения b , наблюдаемый только при $\mu = 0,001$, представляет собой отрицательную одиночную полосу, совпадающую по положению и интенсивности со спектром ИКД соединения 1 при максимальной концентрации ДНК (см. рис. 4, a , кривая b) и свидетельствующую об отсутствии взаимодействия между связанными молекулами лиганда. Спектр ИКД соединения 2 в присутствии ионов K^+ , напротив, имеет чисто экситонный характер (см. рис. 4, b). Можно предположить, что в этих условиях соединение связывается с ДНК в виде димера, на что указывает и форма спектров поглощения на рис. 2, b .

Присутствие производных ксантона при титровании соединения 1 не влияет на характер его спектров ИКД. В то же время в присутствии производных карбазола (см. рис. 4, b) увеличение концентрации ДНК в растворе приводит к постепенному переходу от спектра ИКД экситонного типа, характерного для внешнего связывания, к спектру ИКД в виде одиночной отрицательной полосы, характерной для интеркаляционного связывания феноксазона с ДНК.

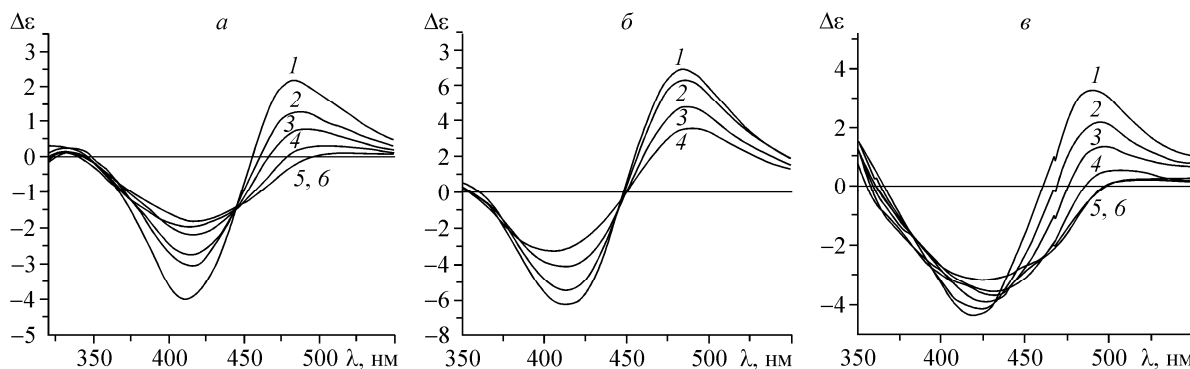


Рис. 4. Спектры индуцированного КД производных актиноцина, связанных с ДНК при разном содержании лиганда в комплексе (r) в 0,1 М КСl (спектры нормированы на концентрацию связанного лиганда): a — соединение 1: $r = 0,45$ (1), 0,40 (2), 0,30 (3), 0,18 (4), 0,10 (5); соединение 2: $r = 0,05$ (6); b — соединение 2: $r = 0,13$ (1), 0,065 (2), 0,033 (3), 0,015 (4); c — соединение 1 в присутствии соединения 11: $r = 0,42$ (1), 0,33 (2), 0,27 (3), 0,22 (4), 0,12 (5), 0,06 (6)

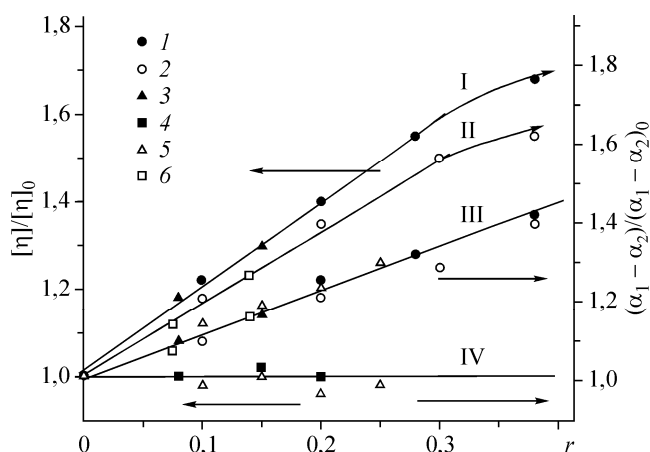


Рис. 5. Относительные изменения характеристической вязкости (I, II, IV) и оптической анизотропии сегмента макромолекулы (III, IV) в зависимости от количества связанного лиганда r в комплексах ДНК с соединениями 1 (I) и 5 (2) в 0,1 М КСl; 2 в 0,1 М NaCl (3) и в 0,1 М КСl (5); 3 (6) и 6 (4) в 0,001 М КСl

мофора лиганда с двойной спиралью ДНК [18, 19]. На рис. 5 изображены кривые зависимости изменения характеристической вязкости и оптической анизотропии ДНК от количества связанного лиганда при ее взаимодействии с соединениями 1—3, 5 и 6. Наблюдаемое для соединений 1—3 и 5 параллельное увеличение обоих параметров свидетельствует о росте контурной длины ДНК пропорционально количеству лиганда в комплексе [18], что указывает на интеркаляционное связывание с ДНК [28]. Отсутствие заметных изменений параметров ДНК при связывании соединения 6 говорит в пользу расположения хромофора в малой бороздке двойной спирали ДНК [29]. При взаимодействии с ДНК соединения 2 в 0,1 М КСl наблюдается возрастание оптической анизотропии и отсутствие изменений характеристической вязкости. Такое поведение макромолекулярных параметров ДНК при связывании соответствует расположению хромофора снаружи двойной спирали и его ориентации перпендикулярно ее оси.

ВЫВОДЫ

Сопоставление спектральных, оптических и гидродинамических свойств комплексов ДНК с исследованными соединениями позволяет предложить модели связывания краунсодержащих производных актиноина.

Все исследованные характеристики комплексов ДНК с соединением 1 в присутствии ионов K^+ аналогичны наблюдаемым ранее в присутствии ионов Na^+ [23] и свидетельствуют о его интеркаляции в двойную спираль ДНК. Таким же образом взаимодействует с ДНК соединение 5. Способ связывания соединения 2 зависит от размера и концентрации катиона: при 0,1 М NaCl — интеркаляционное связывание; при 0,001 М NaCl — расположение хромофора в малой бороздке ДНК; при 0,1 М КСl — взаимодействие снаружи двойной спирали ДНК в виде димеров; при 0,001 М КСl — интеркаляционное связывание. Хромофор соединения 6 при связывании с ДНК располагается в малой бороздке двойной спирали. Соединение 3 взаимодействует с ДНК только при 0,001 М КСl предположительно интеркаляционным способом. Феноксазоновый хромофор в составе соединений 4 и 7 практически не взаимодействует с молекулой ДНК. Однако нельзя исключить их электростатическое взаимодействие с фосфатными группами ДНК через краун-группировки, ассоциирующие ионы Na^+ или K^+ .

Можно предположить, что благодаря наличию двух краун-группировок молекула может принимать различные конформации в зависимости от длины спейсера, соединяющего краун-группировки с хромофором, или от количества ассоциированных ионов щелочного металла. Конформация молекулы определяет способ ее связывания с двойной спиралью ДНК.

В случае соединений с одной краун-группировкой (соединения 9 и 11) последние не оказывают влияния на взаимодействие хромофора с ДНК. Производные ксантона конкурируют с производным феноксазона 1 за места связывания на ДНК и следовательно являются интеркалирующими в двойную спираль соединениями. В присутствии производных карбазола уменьшается константа связывания производного феноксазона, а количество мест связывания, напротив, увеличивается, и изменяется вид спектров ИКД. Можно предположить, что производные

карбазола связываются снаружи двойной спирали ДНК, взаимодействуя с производным феноксазона и препятствуя его интеркаляции.

Сродство к ДНК всех исследованных соединений в присутствии ионов K^+ выше, чем в присутствии ионов Na^+ .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roomans G., von Euler A. // Cell Biol. Int. – 1996. – **20**. – P. 103 – 109.
2. Smith P., Rhodes N.P., Shortland A.P. et al. // FEBS Lett. – 1998. – **423**. – P. 19 – 24.
3. Besson P., Gore J., Vincent E. // Biochem. Pharmacol. – 1996. – **51**. – P. 1153 – 1158.
4. Kimura K., Shono T. In: Cation Binding by Macrocycles / Eds. Y. Inoue and G.W. Gokel. – N. Y.: Marcel Dekker, 1990. – P. 429 – 463.
5. Fery-Forgues S., Al-Ali F. // J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev. – 2004. – **5**. – P. 139 – 153.
6. Fernandez M.J., Grant K.B., Yerraiz F. et al. // Tetrahedron Lett. – 2001. – **42**. – P. 5701 – 5704.
7. Basak A., Dugas H. // Ibid. – 1986. – **27**. – P. 3 – 6.
8. Fukuda R., Takenaka S., Tagaki M. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. – 1990. – **15**. – P. 1028 – 1030.
9. Глибин Е.Н., Плеханова Н.Г., Овчинников Д.В., Коршунова З.Н. // Журн. орган. химии. – 1996. – **32**. – С. 406 – 408.
10. Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г. // Там же. – 1997. – **33**. – С. 1573 – 1576.
11. Яворская Н.П., Голубева И.С., Кубасова И.Ю. и др. // Хим.-фарм. журн. – 2001. – **35**. – С. 15 – 18.
12. Морошкина Е.Б. // Вестник СПбГУ. Сер. 4. – 2007. – № 2. – С. 17 – 23.
13. Muller W., Crothers D.M. // J. Mol. Biol. – 1968. – **35**. – P. 251 – 268.
14. Sobell H.M. In: Nucleic Acid Geometry and Dynamics / Ed. R.H. Sarma. – N. Y.: Pergamon Press, 1980. – P. 289 – 323.
15. Кривцова М.А., Морошкина Е.Б., Глибин Е.Н., Фрисман Э.В. // Молекуляр. биол. – 1984. – **18**. – С. 950 – 956.
16. Морошкина Е.Б., Кривцова М.А., Юдина И.Г., Глибин Е.Н. // Там же. – 1998. – **32**. – С. 545 – 549.
17. Морошкина Е.Б., Кузьменко Е.В., Кривцова М.А., Глибин Е.Н. // Там же. – 2000. – **34**. – С. 448 – 455.
18. Морошкина Е.Б., Шишов А.К., Кривцова М.А. и др. // Там же. – 1975. – **9**. – С. 836 – 844.
19. Веселков А.Н., Морошкина Е.Б., Соболева О.И., Фрисман Э.В. // Там же. – 1984. – **18**. – С. 481 – 487.
20. Peterlin A. // J. Polym. Sci. – 1950. – **12**. – P. 45 – 52.
21. Фрисман Э.В., Цветков В.Н. // Журн. экспер. и теор. физ. – 1952. – **23**. – С. 690 – 702.
22. Фрисман Э.В., Шагина Л.В., Воробьев В.И. // Коллоид. журн. – 1965. – **27**. – С. 130 – 133.
23. Кривцова М.А., Морошкина Е.Б., Глибин Е.Н., Фрисман Э.В. // Молек. биол. – 1982. – **16**. – С. 149 – 155.
24. McGhee J.D., von Hippel P.N. // J. Mol. Biol. – 1974. – **86**. – P. 469 – 482.
25. Norden B., Tjerneld F. // Biopolymers. – 1982. – **21**. – P. 1713 – 1734.
26. Tuite E., Norden B. // J. Amer. Chem. Soc. – 1994. – **116**. – P. 7548 – 7556.
27. Tinoco J.I., Woody R.W. // J. Chem. Phys. – 1963. – **38**. – P. 1317 – 1325.
28. Lerman L.S. // J. Mol. Biol. – 1961. – **3**. – P. 18 – 24.
29. Braitwaite A.W., Baguley B.C. // Biochem. – 1980. – **19**. – P. 1101 – 1106.