

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С ИОНАМИ Cu^{2+} И Mg^{2+} В ПРИСУТСТВИИ КОФЕИНА**С.В. Пастон, А.М. Поляничко, О.В. Шуленина***Санкт-Петербургский государственный университет, Физический факультет, Россия*

E-mail: svpaston@list.ru

Статья поступила 11 мая 2016 г.

Изучено влияние кофеина на комплексообразование молекулы ДНК с ионами Cu^{2+} и Mg^{2+} в растворе. Связывание ДНК с катионами и кофеином фиксировали по изменению спектров кругового дихроизма и УФ поглощения ДНК. Комплексообразование кофеина с ионами M^{2+} изучали методом ИК спектроскопии. Обнаружено, что кофеин в растворе образует комплексы различной структуры с ионами Mg^{2+} и Cu^{2+} . В присутствии кофеина в растворах ДНК с MCl_2 наблюдаются признаки образования сложных комплексов с участием азотистых оснований. В растворах ДНК с CuCl_2 присутствие кофеина вызывает дополнительную дестабилизацию вторичной структуры ДНК. В растворах ДНК с MgCl_2 введение кофеина приводит к образованию новых комплексов с участием Mg^{2+} , кофеина и оснований без нарушения вторичной структуры ДНК.

DOI: 10.15372/JSC20170226

Ключевые слова: ДНК, кофеин, ионы металлов, УФ поглощение, круговой дихроизм, ИК спектроскопия, вторичная структура ДНК.

Кофеин входит в состав многих популярных напитков, продуктов питания, косметики, а также лекарственных препаратов и употребляется человечеством на протяжении веков. Биологическая активность кофеина привлекает к себе внимание большого круга исследователей. В последние годы были обнаружены новые факты о влиянии кофеина на внутриклеточные процессы. Показано, что кофеин влияет на катаболизм [1], может ингибировать процессы синтеза ДНК [2, 3], а также ее репарацию [4–6]. Установлено, что кофеин обладает способностью эффективно ослаблять канцерогенное действие УФ излучения [7, 8]. Показано радиопротекторное действие кофеина при γ -облучении ДНК в растворе [9, 10]. В присутствии кофеина в клетке и *in vitro* уменьшается степень связывания ДНК с соединениями-интеркаляторами [11–14], что позволяет исследователям сделать вывод о его антимуtagenном действии. Есть данные о том, что в клетках кофеин может проявлять антиоксидантную активность [15]. Chattopadhyay с соавт. показали, что в присутствии катионов Cu^{2+} кофеин действует как прооксидант [16], причем авторы предполагают, что прооксидантной активностью обладает именно комплекс кофеина с Cu^{2+} . Способность кофеина конкурировать с молекулой ДНК за ионы двухвалентных металлов в растворе изучают достаточно давно [17, 18], однако вопрос о механизмах и самой возможности образования комплексов кофеина с такими ионами до сих пор остается открытым. Данная работа посвящена изучению взаимодействия ДНК с катионами Cu^{2+} и Mg^{2+} в присутствии кофеина в растворе и выявлению возможного комплексообразования кофеина с исследуемыми катионами.

Известно, что ионы переходных металлов (в частности, Cu^{2+}) образуют комплексы как с фосфатными группами, так и с азотистыми основаниями ДНК, тогда как ионы щелочных и щелочноземельных металлов (в т.ч. Mg^{2+}) взаимодействуют в основном с фосфатными группами [19—27]. Взаимодействие катионов переходных металлов с основаниями ДНК ярко проявляется в спектрах кругового дихроизма (КД) ДНК: наблюдается снижение интенсивности положительной полосы, а также смещение точки $\Delta\epsilon = 0$ в длинноволновую область [20, 21]. Мы использовали метод КД для обнаружения возможных изменений степени связывания оснований ДНК с катионами в присутствии кофеина. Состояние вторичной структуры ДНК в ходе комплексообразования фиксировали по спектрам УФ поглощения. Взаимодействие кофеина с катионами металлов в водном растворе изучали методом ИК спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали ДНК из тимуса телят (Sigma, США) молекулярной массы $M = (10,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$ Да. Молекулярная масса ДНК была определена по значению характеристической вязкости $[\eta]$ в растворе 0,15 М NaCl [28]. Концентрацию ДНК в растворе (C) определяли по методу Спирина [29]. Нативность ДНК контролировали по величине молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{260}(P)$. Поглощение растворов ДНК в УФ диапазоне измеряли на спектрофотометре СФ-56 (Россия) в кювете с длиной оптического пути $l = 1$ см. Спектры КД регистрировали на дихрографе Mark IV (Jobin Yvon, Франция) в цилиндрической кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 1$ см. Спектры КД регистрировали с шагом 0,1 нм и усредняли по трем последовательным измерениям. Концентрация поддерживающего электролита в растворах ДНК была 0,005 М NaCl. Использовали кофеин фирмы "Sigma". Для получения растворов MgCl_2 и CuCl_2 были использованы соли марки ХЧ. Растворы ДНК и кофеина, содержащие соли MCl_2 , готовили простым сливанием исходных растворов компонентов. Трехкомпонентные растворы, содержащие ДНК, кофеин и MCl_2 готовили следующим образом: сначала были приготовлены смеси, содержащие ДНК и MCl_2 , либо ДНК и кофеин, либо кофеин и MCl_2 , их выдерживали 1,5 ч при температуре $+4$ °С, и далее в каждую пробу был добавлен третий компонент. Затем эти растворы выдерживали в течение суток при температуре $+4$ °С. Именно такой температурный режим применяется повсеместно для хранения водных растворов и лиофилизированных образцов ДНК. В этих условиях ДНК в растворе остается стабильной в течение нескольких месяцев [30]. Спустя сутки после приготовления систем проводили измерения при температуре $+20$ °С.

ИК спектр сухого образца кофеина был получен на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Scientific) с использованием алмазной ячейки однократно нарушенного полного внутреннего отражения. Оптические пути прибора в ходе измерения продували сухим воздухом. ИК спектры водных (D_2O) растворов кофеина получены на однолучевом Фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker, Германия). Измерения проводили в разборной прямоугольной кювете BaF_2 с длиной оптического пути $l = 50$ мкм. Для продувки оптических путей прибора использовали азот. Каждый полученный спектр является результатом усреднения 200 последовательно измеренных спектров с разрешением 2 см^{-1} . Для достижения полного изотопного замещения приготовленные растворы высушивали на концентраторе биомолекул (Eppendorf, Германия) при температуре 45 °С, перерастворяли в нужном объеме D_2O и выдерживали в течение 3 суток при температуре $+4$ °С. Эту процедуру повторяли трехкратно. Обработку ИК спектров проводили с помощью пакета Opus 7.0, поставляемого производителем спектрометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в работе спектры УФ поглощения и КД ДНК в растворах MgCl_2 и CuCl_2 хорошо согласуются с известными данными [20] (рис. 1, а, б, 2, а, б, спектры 1 и 2). В присутствии ионов Mg^{2+} наблюдается незначительное снижение интенсивности спектров поглощения и КД ДНК, что связывают с усилением экранировки фосфатных групп и, вследствие этого,

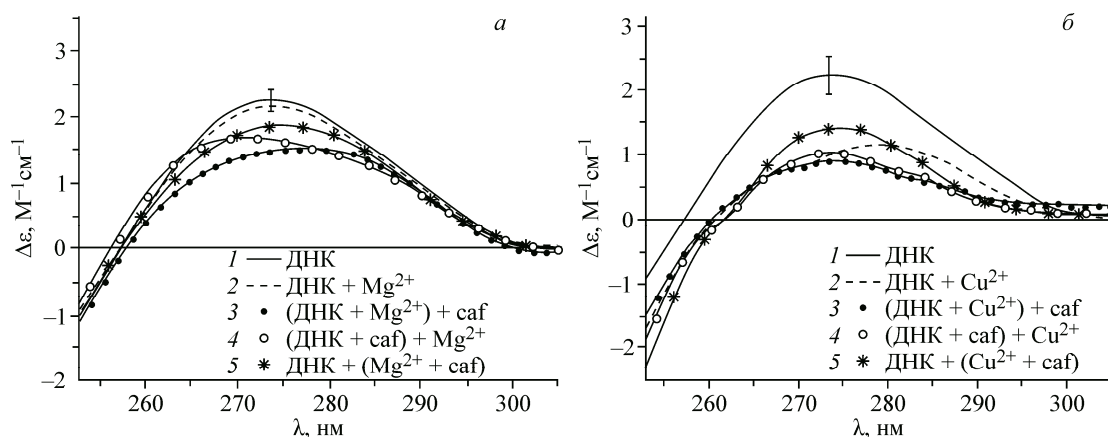


Рис. 1. Спектры КД ДНК в растворах, содержащих кофеин (caf) и $MgCl_2$, при разном порядке введения компонентов в раствор. $C_{\text{ДНК}} = 0,003 \text{ г/дл} = 9 \cdot 10^{-5} \text{ М}_{\text{ао}}$, $C_{\text{caf}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{MgCl_2} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

сближением соседних азотистых оснований [31]. В спектрах поглощения растворов ДНК, содержащих Cu^{2+} , помимо уменьшения интенсивности возникает батохромный сдвиг, который объясняется взаимодействием катионов меди с азотистыми основаниями ДНК [20]. В спектре КД ДНК комплексобразование оснований с ионами Cu^{2+} проявляется в виде значительного снижения интенсивности положительной полосы и сдвига точки $\Delta\epsilon = 0$ в длинноволновую область. Концентрации двухвалентных катионов были нами выбраны равными $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, исходя из данных об изменении спектральных параметров ДНК при взаимодействии с ионами меди [32]. В области $C_{CuCl_2} < 5 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ происходят наиболее резкие изменения интенсивности положительного максимума в спектре КД ДНК и положения точки $\Delta\epsilon = 0$. Малейшие изменения концентрации $CuCl_2$ в этой области приводят к очень заметным спектральным изменениям. Таким образом, именно в этой области концентраций следовало бы ожидать возможного проявления перехвата катионов меди молекулами кофеина, которое обсуждается в работе [17]. Концентрации $MgCl_2$ в исследуемых системах были выбраны по аналогии с $CuCl_2$, чтобы иметь возможность сравнения между собой полученных результатов. Как уже упоминалось, ионы магния взаимодействуют преимущественно с фосфатными группами ДНК, что не приводит к заметному изменению спектров КД и УФ поглощения ДНК.

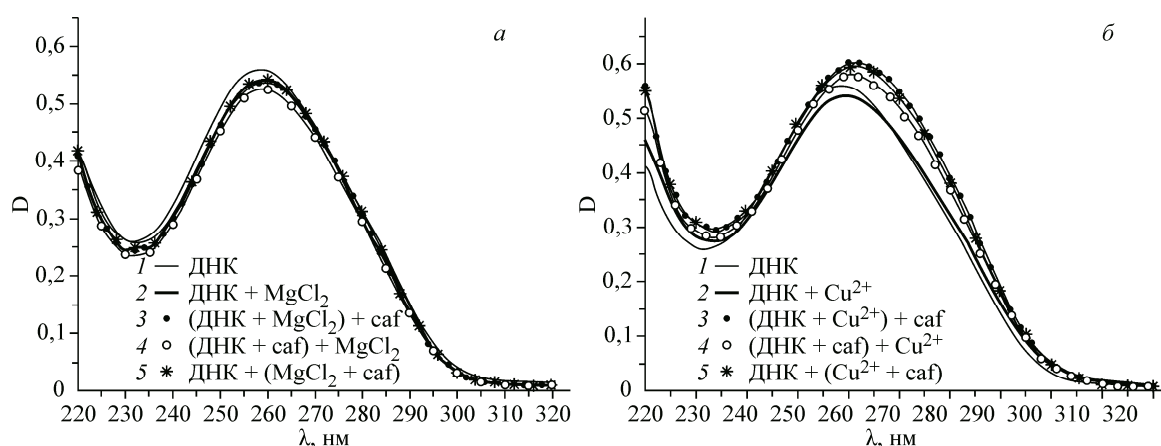


Рис. 2. Спектры УФ поглощения ДНК в растворах, содержащих кофеин (caf) и $MgCl_2$, при разном порядке введения компонентов в раствор. Приведены разностные спектры, т.е. результат вычитания из спектра смеси спектра соответствующего растворителя, содержащего caf и $MgCl_2$. $C_{\text{ДНК}} = 0,003 \text{ г/дл} = 9 \cdot 10^{-5} \text{ М}_{\text{ао}}$, $C_{\text{caf}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{MgCl_2} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

Рассмотрим трехкомпонентные системы, содержащие CuCl_2 . Разностные спектры УФ поглощения этих систем (см. рис. 2, б, спектры 3—5) при всех способах приготовления заметно отличаются от спектров нативной ДНК и ДНК в растворе CuCl_2 : интенсивность поглощения возрастает и сохраняется bathochromный сдвиг. Можно предположить, что происходит некоторая дестабилизация вторичной структуры ДНК в трехкомпонентных системах. Спектры КД этих систем представлены на рис. 1, б (спектры 3—5). Признаки взаимодействия катионов меди с азотистыми основаниями наблюдаются во всех полученных спектрах. В системе 5, в которой к раствору ДНК добавляли смесь кофеина с CuCl_2 , наблюдается небольшое увеличение интенсивности положительной полосы в спектре КД, но вместе с тем bathochromный сдвиг точки $\Delta\epsilon = 0$ даже несколько увеличивается по сравнению с системой 2. Таким образом, в присутствии кофеина не наблюдается признаков снижения степени связывания ионов Cu^{2+} с азотистыми основаниями.

Обратимся к рассмотрению аналогичных комплексов в присутствии MgCl_2 . Разностные спектры поглощения ДНК в трехкомпонентных системах практически совпадают со спектром ДНК с MgCl_2 в отсутствие кофеина (см. рис. 2, а). Можно заключить, что вторичная структура ДНК в этих системах не нарушена. Однако в спектрах КД этих систем (см. рис. 1, а) наблюдаются заметные изменения: снижается интенсивность положительной полосы, меняется форма полосы и положение максимума. Можно предположить, что введение кофеина в раствор ДНК с MgCl_2 приводит к образованию новых комплексов с участием азотистых оснований. Ближе всего к спектру нативной ДНК спектр системы 5, в которой к раствору ДНК добавляли смесь кофеина с MgCl_2 . Возможно, что в этом случае комплексообразование с основаниями менее выражено. Можно допустить, что наблюдаемые изменения характера взаимодействия ионов металлов с азотистыми основаниями ДНК в трехкомпонентных системах связаны с образованием комплексов кофеина с ионами. Для выявления и характеристики этих комплексов были предприняты дальнейшие исследования с помощью ИК спектроскопии.

ИК спектр кофеина в сухом образце показан на рис. 3. На рис. 4 приведены серии ИК спектров растворов кофеина с MgCl_2 и CuCl_2 в D_2O при разных молярных отношениях (концентрация кофеина оставалась постоянной — 0,5 ммоль/л). В ИК спектре раствора кофеина линия 980 см^{-1} показывает относительно слабые спектральные изменения при варьировании концентраций MgCl_2 и CuCl_2 , как нами было замечено в ходе эксперимента. Предположительно, этот пик отвечает колебаниям связи $\text{C}-\text{C}$ в кольце кофеина [33]. По-видимому, это колебание весьма консервативно и мало меняет свои параметры в условиях эксперимента. Это позволило нам выбрать данный пик в качестве нормировочного. Процедура нормировки спектров на интенсивность одной из полос позволяет анализировать относительные изменения интенсивностей

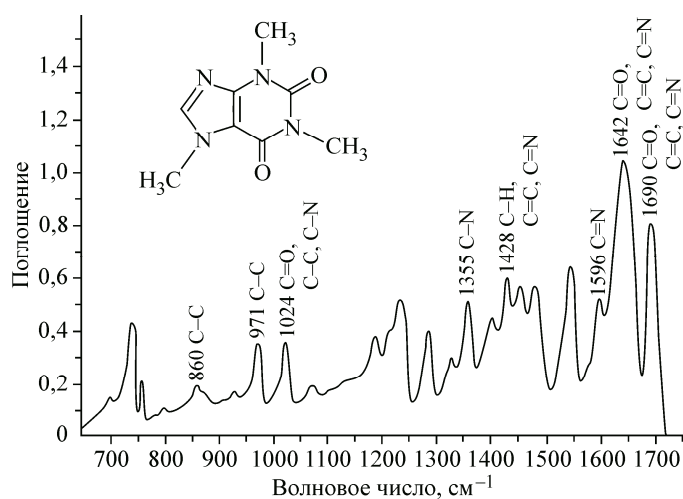


Рис. 3. ИК спектр сухого кофеина.
Отнесение линий в спектре, согласно [33, 34]

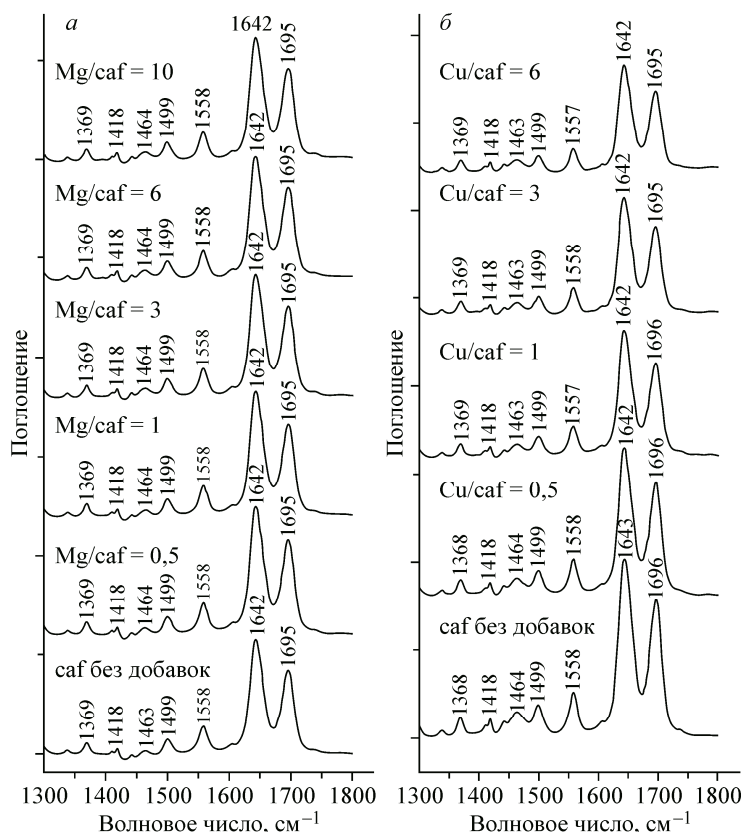


Рис. 4. Серии ИК спектров растворов кофеина с MgCl_2 (а) и CuCl_2 (б) при разных молярных отношениях компонентов. $C_{\text{caf}} = \text{const}$. Отнесение линий в спектре, согласно [33, 34]: 1369 cm^{-1} (C—N); 1418 cm^{-1} (C=C, C—H, C=N); 1358 — 1470 cm^{-1} (CH_3); 1642 cm^{-1} и 1695 cm^{-1} (C=O, C=C, C=N)

спектральных полос. Это дает возможность учесть изменения в концентрациях и оптических путях при сравнении спектров различных образцов. В спектре ИК поглощения кофеина в присутствии ионов Mg^{2+} положения полос остаются неизменными по сравнению со спектром чистого кофеина, тогда как присутствие Cu^{2+} вызывает смещение максимумов некоторых полос в пределах 1 cm^{-1} (см. рис. 4). В обоих случаях наблюдаются изменения интенсивностей спектральных полос (рис. 5). Это может свидетельствовать о более сильном взаимодействии ионов Cu^{2+} с кофеином по сравнению с ионами Mg^{2+} . Наиболее вероятно, что в исследованном диапазоне концентраций наблюдается прямое взаимодействие ионов Cu^{2+} с карбонильными группами кофеина, тогда как ионы Mg^{2+} взаимодействуют лишь опосредованно через молекулу воды [25]. Данное предположение подтверждается различным характером наблюдаемых изменений в системах кофеин — Mg^{2+} и кофеин — Cu^{2+} (см. рис. 4 и 5).

Следя за интенсивностями полос 1642 и 1695 cm^{-1} , можно сделать вывод о состоянии валентных колебаний карбонильных групп (хотя в этой полосе присутствует также вклад колебаний связей C=C и C=N в гетероциклах кофеина). Полоса 1418 cm^{-1} независимо несет информацию о колебаниях связей C=C и C=N. Полоса 1464 cm^{-1} относится к деформационным колебаниям метильных групп [33, 34]. При $[\text{Mg}]/[\text{caf}]$ от 0 до 1 наблюдается рост поглощения полос 1642 и 1695 cm^{-1} , в то же время интенсивность полосы 1418 cm^{-1} меняется слабо. Увеличение интенсивности при 1642 и 1695 cm^{-1} следует отнести к изменениям колебаний карбонильных групп — наиболее электроотрицательных в молекуле кофеина. Поскольку в условиях эксперимента не наблюдали регистрируемого смещения полос в комплексе с ионами Mg^{2+} , можно предположить наличие комплекса $\text{Caf—H}_2\text{O—Mg}^{2+}$. Снижение интенсивности полос при дальнейшем увеличении содержания Mg^{2+} может, предположительно, быть следствием возникновения агрегатов молекул кофеина.

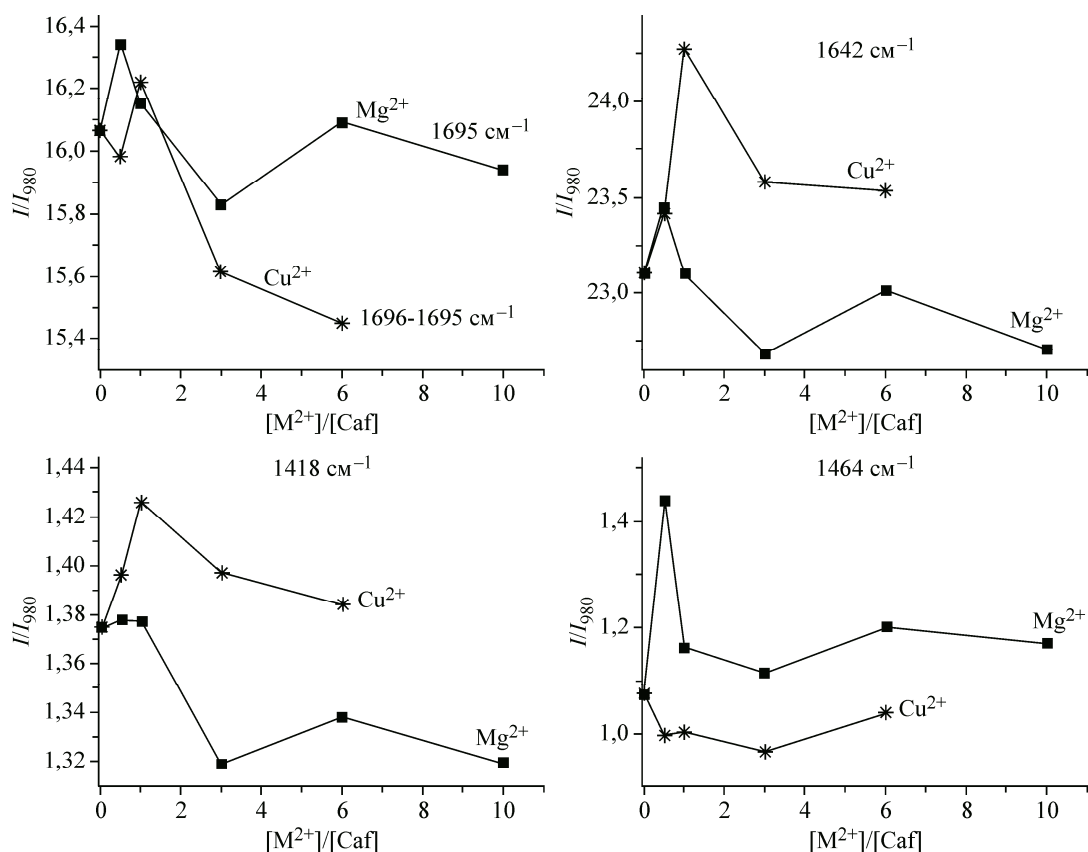


Рис. 5. Относительные интенсивности некоторых полос в ИК спектре кофеина в растворе как функция содержания MCl_2 . $C_{caf} = \text{const}$

В растворах кофеина с Cu^{2+} при $[Cu]/[caf]$ от 0 до 1 зарегистрирован рост интенсивностей полос 1642 и 1696 cm^{-1} (колебания $C=O$), полосы 1418 cm^{-1} (колебания $C=C$, $C=N$), а также сдвиг их максимумов на 1 cm^{-1} при высоком содержании ионов Cu^{2+} . На основании этого можно предположить, что взаимодействие кофеина с Cu^{2+} более сильное, чем у Mg^{2+} , и приводит к изменениям колебаний колец гетероцикла. Интересно отметить перераспределение интенсивностей в полосах: рост поглощения на 1696, 1642 и 1418 cm^{-1} сопровождается падением интенсивности полосы 1464 cm^{-1} . По-видимому, в комплексе наблюдаются стерические ограничения, вызванные присутствием метильных групп.

Таким образом, можно заключить, что кофеин в растворе образует комплексы различной структуры с ионами Mg^{2+} и Cu^{2+} . Это комплексообразование не препятствует взаимодействию катионов с молекулой ДНК. Более того, в присутствии кофеина в растворах ДНК с MCl_2 наблюдаются признаки образования сложных комплексов, включающих азотистые основания. В растворах ДНК с $CuCl_2$ присутствие кофеина вызывает дополнительную дестабилизацию вторичной структуры ДНК. В растворах ДНК с $MgCl_2$ введение кофеина вовлекает в комплексообразование азотистые основания, что приводит к изменению спектров КД ДНК, однако не сопровождается нарушениями вторичной структуры ДНК.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

Авторы благодарят сотрудников РЦ Е.В. Борисова и А.В. Поволоцкую за помощь в измерении ИК спектров.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sherman H., Gutman R., Chapnik N. et al.* // *Internat. J. Biochem. & Cell Biology.* – 2011. – **43**. – P. 829.
2. *Bhaskara S., Dean E.D., Lam V., Ganguly R.* // *Gene.* – 2006. – **377**. – P. 56.
3. *Johnson I.M., Kumar S.G., Malathi R.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2003. – **20**. – P. 687.
4. *Araya R., Hirai I., Meyerkord C.L., Wang H.-G.* // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**. – P. 157.
5. *Conney A.H., Zhou S., Lee M.-J. et al.* // *Toxicol. Appl. Pharm.* – 2007. – **224**. – P. 209.
6. *Kaufmann W.K., Heffernan T.P., Beaulieu L.M. et al.* // *Mutat. Res.* – 2003. – **532**. – P. 85.
7. *Kerzendorfer C., O'Driscoll M.* // *J. Invest. Dermatol.* – 2009. – **129**. – P. 1611.
8. *Conney A.H., Lu Y.-P., Lou Y.-R., Kawasumi M., Nghiem P.* // *Frontiers in Oncology.* – 2013. – **3**. – P. 1.
9. *Осипов Н.Д., Кондратьева О.П., Фрисман Э.В.* // *Вестн. ЛГУ.* – 1979. – № 4. – С. 98.
10. *Пастон С.В., Тарасов А.Е.* // *Журн. структур. химии.* – 2011. – **52**. – С. 1246.
11. *Веселков Д.А., Сигаев В.А., Высоцкий С.А. и др.* // *Журн. структур. химии.* – 2000. – **41**. – С. 86.
12. *Битехтина М.А., Векиин Н.Л.* // *Биоорганич. химия.* – 2008. – **34**. – С. 256.
13. *Banerjee S., Bhowmik D., Verma P.K. et al.* // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – **115**. – P. 14776.
14. *Baranovsky S.F., Bolotin P.A., Evstigneev M.P., Chernyshev D.N.* // *J. Appl. Spectr.* – 2009. – **76**. – P. 132.
15. *Endesfelder S., Zaak I., Weichelt U., Buhner C., Schmitz T.* // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2014. – **67**. – P. 221.
16. *Chattopadhyay D., Somaiah A., Raghunathan D., Thirumurugan K.* // *Scientifica.* – 2014. – Article ID 649261.
17. *Пучкова А.О., Касьяненко Н.А.* // *Вестн. СПбГУ. Сер. Физика, химия.* – 2011. – вып. 2. – С. 96.
18. *Nafisi S., Sadjadi A.S., Zadeh S.S., Damerchelli M.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2003. – **21**. – P. 289.
19. *Зенгер В.* *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.* – М.: Мир, 1987.
20. *Касьяненко Н.А., Дьяконова Н.Е., Фрисман Э.В.* // *Мол. биол.* – 1989. – **23**. – С. 975.
21. *Polyanichko A.M., Andrushchenko V.V., Chikhirzhina E.V., Vorob'ev V.I., Wieser H.* // *Nucleic Acids Research.* – 2004. – **32**. – P. 989.
22. *Полянничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрущенко В.В., Wieser H., Воробьев В.И.* // *Биофизика.* – 2005. – **50**. – С. 810.
23. *Полянничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрущенко В.В., Костылева Е.И., Wieser H., Воробьев В.И.* // *Мол. биол.* – 2004. – **38**. – С. 701.
24. *Полянничко А.М., Чихиржина Е.В., Костылева Е.И., Воробьев В.И.* // *Мол. биол.* – 2004. – **38**. – С. 1041.
25. *Tajmir-Riahi H.-A., Messaoudi S.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1992. – **10**. – P. 345.
26. *Касьяненко Н.А., Сэльман-Хусейн Соса Г., Уверский В.Н., Фрисман Э.В.* // *Мол. биол.* – 1987. – **21**. – С. 140.
27. *Касьяненко Н.А.* // *Журн. структур. химии.* – 2006. – **47**. – С. 163.
28. *Eigner J., Doty P.* // *J. Mol. Biol.* – 1965. – **12**. – P. 549.
29. *Спирин А.С.* // *Биохимия.* – 1958. – **23**. – С. 656.
30. *Molecular Biology and Pathology: A Guidebook for Quality Control.* / Ed. D.H. Farkas. – San Diego: Academic Press, 1993.
31. *Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Schyolkina A.K., Poletaev A.I.* // *Biopolymers.* – 1973. – **12**. – P. 89.
32. *Пастон С.В., Ушков П.А.* // *Вестн. СПбГУ. Сер. 4: Физика, химия.* – 2014. – **1 (59)**. – Вып. 4. – С. 508.
33. *Paradkar M.M., Irudayaraj J.* // *J. Food Science.* – 2002. – **67**. – P. 2507.
34. *Беллами Л.* *Инфракрасные спектры сложных молекул.* – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963.