

УДК 577.113

М.П. Евстигнеев¹, А.С. Чубаров¹, А.А. Эрнандес Сантьяго²

¹ Кафедра физики, Севастопольский национальный технический университет, Студгородок, Севастополь, 99053, Украина

E-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

² Департамент физики и математики, Автономный университет

г. Пуэбла, 72570, Мексика

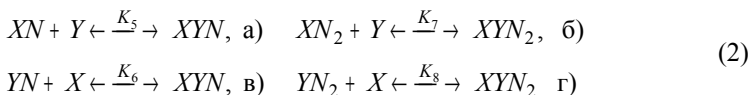
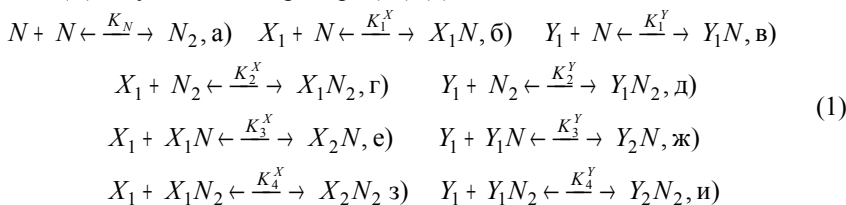
УЧЕТ КООПЕРАТИВНОСТИ ПРИ АНАЛИЗЕ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ С ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДАМИ

Предложена модель, учитывающая кооперативность реакций комплексообразования ароматических лигандов с тетрамером ДНК при анализе совместного действия биологически активных веществ на ДНК. Показано, что уточненные константы комплексообразования в схеме кооперативного конкурентного связывания могут существенно отличаться от констант, используемых в базовой некооперативной схеме.

Введение. Известно, что биологическая активность многих ароматических веществ – антибиотиков, обладающих различными химиотерапевтическими свойствами, красителей, проявляющих мутагенную или канцерогенную активность, и др. обусловлена их высоким сродством к связыванию с молекулами ДНК и РНК в клетке. Вместе с тем, установлено, что активность ароматических веществ может существенно меняться при поступлении в клетку в комбинации с другими ароматическими соединениями [1]. Это имеет важное теоретическое и практическое значение. Так, использование антибиотиков в комбинации принято в клинической практике при лечении опухолевых заболеваний. В отдельных случаях взаимодействие различных антибиотиков может приводить к уменьшению их фармакологического эффекта или наоборот к усилению при взаимодействии с ароматическими молекулами из пищевых источников (полифенолов, метилксантинов, таких как кофеин, и др.), что может определять соответствующие требования к диете в процессе медикаментозного лечения [2].

Проведенные нами исследования *in vitro* показали, что основными механизмами, определяющими взаимное влияние ароматических лигандов при их взаимодействии с нуклеиновыми кислотами являются: гетероассоциация ароматических молекул и конкуренция ароматических лигандов при интеркаляционном связывании с рецепторами – ДНК и РНК [3]. В работе [3] дана полная схема анализа одновременного связывания с дезокси-тетрануклеотидом 5'-d(TGCA) двух интеркаляторов, одним из которых является кофеин. Согласно базовой модели [3] при совместном связывании двух ароматических лигандов X и Y с тетрануклеотидом ABCD, в общую схему комплексообразования вещества X или Y с ABCD (1) добавляются ре-

акции образования смешанных гетерокомплексов XYN и XYN_2 с одиночной нитью (N) и дуплексом тетрамера (N_2) (2):



где K_1 – K_8 – равновесные константы комплексообразования.

В выражении (2) полагается, что

$$K_5 = K_3^Y, \quad K_6 = K_3^X, \quad K_7 = K_4^Y, \quad K_8 = K_4^X, \tag{3}$$

где K_3^Y, K_3^X и K_4^Y, K_4^X – равновесные константы комплексообразования молекул X и Y с мономером и дуплексом ABCD соответственно.

Предположение (3) основано на том, что интеркаляция ароматических лигандов происходит некооперативно согласно модели «исключенного соседа» [4], когда взаимное влияние молекул интеркалированных лигандов в комплексах с тетрамером пренебрежимо мало и не зависит от вида молекулы (X или Y), связывающейся с ДНК на этапе (1), предшествующем реакциям (2) [3]. Вместе с тем для случая коротких олигонуклеотидных последовательностей такое допущение может явиться источником ошибок в определении констант K_5 – K_8 по следующим двум причинам:

1. Известно, что большинство ароматических лигандов селективно связываются с нуклеотидными последовательностями. Рассмотрим случай некооперативного сиквенс-специфичного связывания лигандов X и Y с дуплексом ABCD. Пусть лиганд X преимущественно связывается с сайтом АВ ($K_2^X \gg K_4^X$), а лиганд Y – с сайтом CD ($K_2^Y \gg K_4^Y$). Положим $K_2^X \approx K_2^Y$. Записывая базовую схему (3) $K_7 = K_4^Y$, $K_8 = K_4^X$, получаем, что константы K_7 и K_8 будут иметь относительно малую величину. С другой стороны, при некооперативном специфичном связывании они должны быть близки к соответствующим константам K_2 : $K_7 \approx K_2^Y$, $K_8 \approx K_2^X$ а, следовательно, иметь относительно высокое значение. Таким образом, ошибка, связанная с учетом сиквенс-специфичности, определяется соотношением констант

K_2^X / K_4^X , K_2^Y / K_4^Y и будет всегда проявляться, если даже один из лигандов селективно связывается с определенной последовательностью ДНК.

2. Известно, что многие ароматические лиганды могут связываться с фрагментами ДНК кооперативно или антикооперативно, что является следствием искажения структуры олигонуклеотидного дуплекса, либо наличия у интеркаляторов массивных боковых цепей. Рассмотрим случай кооперативного неспецифического связывания лигандов X и Y с дуплексом ABCD. Пусть вторая молекула вещества X связывается с тетрамером антикооперативно: $K_2^X \gg K_4^X$, а вторая молекула вещества Y — кооперативно: $K_2^Y < K_4^Y$. Положим $K_2^X \approx K_2^Y$. В этом случае в базовом подходе константа $K_7 = K_4^Y$ и в связи с этим имеет относительно высокое значение, в то время как на самом деле интеркаляции Y будет препятствовать уже связанная с тетрамером молекула X , и в этом случае получаем противоположное условие: $K_7 < K_2^Y < K_4^Y$. Можно предположить, что ошибка, связанная с неучетом кооперативности, будет в меньшей степени сказываться на результатах расчета в тех случаях, когда оба лиганда имеют одинаковый характер кооперативности связывания с последовательностью ДНК.

Из проведенного анализа следует, что реальное связывание лиганда с ДНК и соответствующие усредненные константы комплексообразования K_5 - K_8 , определяются одновременно обоими эффектами: сиквенс-специфичностью и фактором кооперативности. Для строгого учета этих эффектов при расчете конкурентного связывания необходимо знать не усредненные, а конкретные значения констант связывания лигандов с каждым сайтом олигонуклеотида ДНК в отдельности. К сожалению, для интеркалирующих лигандов и дезоксиолигонуклеотидных последовательностей подобная информация отсутствует. Тем не менее, учет специфичности и кооперативности связывания лигандов с дезокситетрануклеотидом в схеме (2) может быть произведен на полуэмпирическом уровне.

Модель и анализ. Зная абсолютные значения констант связывания с мономером (K_1 , K_3) и дуплексом (K_2 , K_4) тетрамера, можно количественно определить фактор кооперативности как отношение этих констант: K_1/K_3 и K_2/K_4 . Однако эти отношения соответствуют фактору кооперативности при одновременном связывании двух молекул. При последовательном связывании двух молекул соответствующие константы перемножаются, следовательно, перемножаются и факторы кооперативности, вносимые каждой молекулой, а значит, параметр кооперативности, отнесенный к одной молекуле связывающегося лиганда с мономером (σ_1) и дуплексом (σ_2) ДНК, можно определить как

$$\sigma_1 = \sqrt{\frac{K_1}{K_3}}, \quad \sigma_2 = \sqrt{\frac{K_2}{K_4}}. \quad (4)$$

При таком рассмотрении представляется возможным скорректировать константы в выражении (3) с учетом кооперативности реакций (2):

$$K_5 = K_3^Y \frac{\sigma_1^Y}{\sigma_1^X}, \quad K_6 = K_3^X \frac{\sigma_1^X}{\sigma_1^Y}, \quad K_7 = K_4^Y \frac{\sigma_2^Y}{\sigma_2^X}, \quad K_8 = K_4^X \frac{\sigma_2^X}{\sigma_2^Y}. \quad (5)$$

Из выражений (5) в явном виде следует, что при одинаковом характере кооперативности связывания лигандов X и Y с тетрануклеотидом, погрешность оценки констант в базовой модели (2), (3) будет снижаться.

Используя выражения (4), (5), на основании известных значений усредненных констант комплексообразования K_1 - K_4 (таблица 1) с тетрамером, рассчитаем параметры кооперативности (таблица 2) и соответствующие уточненные константы K_5 - K_8 (таблица 3) в схеме (2) совместного связывания антибиотика дауномицина (DAU) с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) в присутствии акридинового красителя профлавина (PF) и фенантридиновых красителей бромистого этидия (EB) и йодистого пропидия (PI).

Таблица 1 – Равновесные константы комплексообразования ароматических лигандов с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) [3]

Лиганд	K_1 , 10^3 M^{-1}	K_2 , 10^3 M^{-1}	K_3 , 10^3 M^{-1}	K_4 , 10^3 M^{-1}
EB	27±6	72±9	10±3	141±25
PI	36±6	189±24	19±4	101±28
DAU	53±13	560±13	7±1	19±1
PF	1.2±0.2	15±2	7±1	17±3

Таблица 2 – Факторы кооперативности при связывании ароматических лигандов с мономером (σ_1) и дуплексом (σ_2) 5'-d(TGCA)

Лиганд	EB	PI	DAU	PF
σ_1	1.64	1.37	2.78	0.41
σ_2	0.71	1.37	5.55	0.94

Таблица 3 – Значения констант в схеме конкурентного связывания без учета и с учетом кооперативности

Система	модель	K_5 , 10^3 M^{-1}	K_6 , 10^3 M^{-1}	K_7 , 10^3 M^{-1}	K_8 , 10^3 M^{-1}
EB+DAU	Баз.	7±1	10±3	19±1	141±25
	Уточн.	12	6	148	18

PI+DAU	Баз.	7±1	19±4	19±1	101±28
	Уточн.	14	9	77	25
PF+DAU	Баз.	7±1	7±1	19±1	17±3
	Уточн.	47	1	112	3

Из таблицы 3 следует, что константы, рассчитанные по базовой и уточненной моделям, существенно различаются, особенно большие различия имеют место для констант K_7 и K_8 (от 2 до 7 раз). При связывании с одиночной нитью антикооперативность лигандов выражена в меньшей степени (таблица 2,3), что проявляется в меньшем различии констант K_5 и K_6 , рассчитанных по двум моделям.

Вместе с тем следует иметь в виду, что вклад смешанных гетеро-комплексов (схема (2)), как показывают расчеты, не играет определяющей роли в динамическом равновесии в растворе. Это дает основание предположить, что учет фактора кооперативности при связывании ароматического лиганда с тетрамером ДНК, рассмотренный в настоящей работе, скажется в несколько меньшей степени на количественную оценку относительного содержания различных ассоциированных комплексов в смешанном растворе.

Библиографический список

1. Armitage J.O. The role of mitoxantrone in non-Hodgkin's lymphoma / J.O. Armitage // *Oncology*. — 2002. — V. 16. — P. 490–560.
2. Jefferson J.W. Drug and diet interactions: avoiding therapeutic paralysis / J.W. Jefferson // *J. Clin. Psych.* — 1998. — V. 59. — P. 31–39.
3. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *Eur. Biophys. J.* — 2001. — V. 30. — P. 354–366.
4. McGhee J.D. Theoretical aspects of DNA-protein interactions. Cooperative and noncooperative binding of large ligands to one dimensional homogeneous lattice / J.D. McGhee, P.H. von Hippel // *J. Mol. Biol.* — 1974. — V. 86. — P. 463–489.

Поступила в редакцию 21.05.2003 г.