

УДК 577.113

К.А. Рыбакова, С.А. Высоцкий, А.Н. Веселков

Севастопольский национальный технический университет

Севастополь, Студгородок, Украина, 99053

РАСЧЕТ СТРУКТУР ДИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ АНТИОПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ДАУНОМИЦИНА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ С УЧЕТОМ ДАННЫХ ДВУМЕРНОЙ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Методом молекулярной динамики с учетом двумерного эффекта Оверхаузера определены наиболее вероятные пространственные структуры димерного комплекса антрациклинового антибиотика дауномицина в водно-солевом растворе.

Введение. Результаты многочисленных исследований, проведенных к настоящему времени, указывают на существенное влияние процесса самоассоциации ароматических биологически активных соединений на эффективность их комплексообразования с ядерной ДНК и на их медико-биологическую активность. Взаимодействуя с ДНК, эти соединения нарушают матричный синтез и, как следствие, приводят к изменению роста и деления клеток. В качестве примера таких веществ можно привести ароматические лиганды, которые связываются с ДНК путем интеркаляции, т.е. встраиваются между парами оснований ДНК. Такие соединения являются объектом интенсивного изучения по двум причинам: во-первых, эти вещества дают возможность более детального изучения структуры и функций нуклеиновых кислот; во-вторых, многие из них обладают полезными химиотерапевтическими свойствами, из которых особо следует отметить антиканцерогенную активность. К типичным интеркаляторам относятся антрациклиновые антибиотики, которые широко используются для химиотерапии некоторых раковых заболеваний. Среди них антиопухолевый антибиотик дауномицин (рисунок 1) является одним из наиболее эффективных соединений при лечении острой формы миелоидной лейкемии [1].

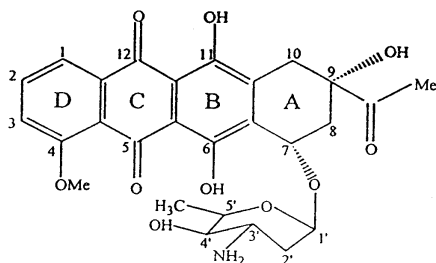


Рисунок 1 – Структурная формула антрациклинового антибиотика дауномицина

Изучение природы самоассоциации, т.е. структуры и термодинамики комплексообразования биологически важных ароматических молекул позволяет получить информацию о природе физико-

химических взаимодействий в растворе, обусловленных структурными особенностями как хромофоров, так и боковых цепей лигандов. Анализ ли-

тературных данных свидетельствует о том, что самоассоциация ароматических молекул красителей и антибиотиков существенно зависит от конфигурации молекул, характера заместителей в хромофоре (наличия гидрофобных и гидрофильных групп), состава и структуры прикрепленной к хромофору боковой цепи, электрического заряда на молекуле и т.п. Эти особенности молекул, очевидно, оказывают влияние и на специфику их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами [2]. Вместе с тем сведения о структуре самоассоциатов дауномицина и термодинамике их образования в водном растворе немногочисленны и противоречивы. Так, например, энтальпия ΔH самоассоциации дауномицина в водном растворе по данным разных авторов принимает значения, отличающиеся друг от друга более чем на порядок – от $\Delta H = -6,3$ кДж/моль [3], $\Delta H = -32$, 6 кДж/моль [4] до $\Delta H = -69$ кДж/моль [5]. Следует при этом отметить, что строгий расчет структур димерных комплексов молекул дауномицина в водном растворе до сих пор не проводился. В настоящей работе представлен расчет структур димерных комплексов ароматических молекул антиопухолевого антибиотика дауномицина методом молекулярной динамики с учетом экспериментальных данных двумерного эффекта Оверхаузера (2D-NOESY спектров) для исследуемой системы.

Методика эксперимента. В настоящей работе дауномицин ("Fluka") использовали без дополнительной очистки, лиофилизовали из D_2O с изотопной чистотой 99,95% ("Sigma") и растворяли в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD=7.1; 0.1 М NaCl), содержащем 10^{-4} моль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Концентрацию ароматических соединений определяли спектрофотометрически – коэффициент экстинкции для дауномицина $\epsilon = 11500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 477 \text{ nm}$) [3]. 1М- и 2М-спектры ^1H ЯМР измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Исследуемые образцы предварительно дегазировали, продувая их азотом в течение 20-30 мин. Химический сдвиг определяли относительно 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфо кислоты (ДСС), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА) [6]. Спектры 2D-NOESY регистрировались при фиксированной температуре $T = 303 \text{ K}$ с использованием стандартной последовательности импульсов при ширине спектров $SW = 5400 \text{ Гц}$, 4096 точек в период детектирования (t_2), 512 приращений времен эволюции (t_1) и при трех временах смешивания $\tau_{m1} = 90$, $\tau_{m2} = 200$ и $\tau_{m3} = 300$ мс. Спектры 2D-TOCSY измеряли при той же температуре, используя 2048 точек в t_2 и 256 приращений в t_1 . Период восстановления составлял 1,5 с для 2D-TOCSY и 3 с для 2D-NOESY. Для увеличения чувствительности импульсная последовательность при каждом t_1 повторя-

лась 16 и 32 раза для 2D-TOCSY и 2D-NOESY соответственно. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли BVT-регулятором.

Результаты и их обсуждение. Анализ 2D-NOESY спектров (рисунок 2) свидетельствует о том, что в растворах антибиотика наблюдаются кросс-пики между протонами, которые при условии проведения эксперимента с малыми временами смешивания, исключают влияние эффектов диффузии спинов, следует отнести к межмолекулярным взаимодействиям близко расположенных в пространстве протонов молекул. Полученные экспериментальные результаты позволяют сделать предположение о существовании двух пространственных структур самоассоциатов в растворе – с параллельной и антипараллельной ориентацией хромофоров дауномицина в димерном комплексе.

Кросс-пики (темные стрелки на рисунке 2) между протонами H1/H2 – H8, H2/H3 – H10, H1 – H7, H1' – H1/H2, H5' – H1/H2, 4OMe – H10 свидетельствуют о расположении кольца А хромофора одной молекулы над кольцом D хромофора другой молекулы, то есть об их антипараллельной ориентации. Кросс-пики (светлые стрелки) между протонами H7/H8 – H1', H10 – 5'Me/H5'/H3', 4OMe – H2/H3 указывают на существование параллельной структуры димерного комплекса, где одноименные ароматические кольца,

содержащие одинаковые протоны, располагаются друг под другом. При этом можно предположить, что в таком комплексе имеет место положительный угол закручивания плоскостей хромофоров, так что сахара боковой цепи дауномицина располагаются по правой спирали, как в олигонуклеотидной цепи [7].

Расчет структур выполнен методами молекулярной механики с использованием программы X-PLOR (версия 3.851). Водное окружение моделировалось молекулами воды в виде TIP3P, размещенными в прямоугольном боксе (1100 молекул). Топология молекул DAU и параметризация их валентных взаимодействий получены с помощью программы XPLO2D с использованием кристаллических структур из PDB-банка данных [8]. Параметры невалентных взаимодействий между атомами соответствуют силовому полю MM3.

На рисунках 3 и 4 представлены найденные в результате расчетов наиболее вероятные антипараллельная и параллельная структуры (с учетом данных 2D-NOESY спектров) димерного комплекса антибиотика дауномицина в водном растворе.

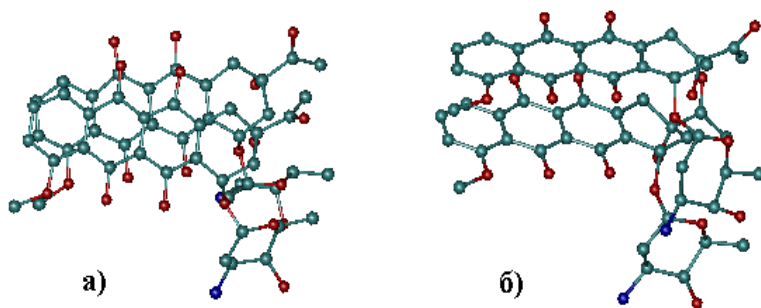


Рисунок 3 – Параллельная пространственная структура димера антибиотика дауномицина:

- а) – вид сверху, перпендикулярно плоскостям хромофоров антибиотика;
- б) – вид на молекулярный ассоциат сбоку

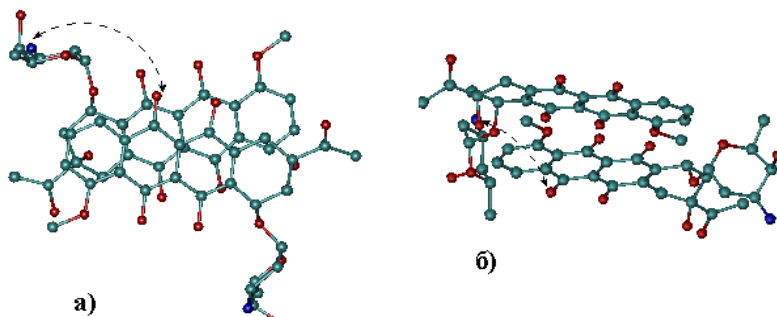


Рисунок 4 – Антипараллельная пространственная структура димера антибиотика дауномицина: а) – вид сверху, перпендикулярно хромофорам антибиотика; б) – вид на молекулярный ассоциат сбоку. Водородная связь между O12 атомом ароматического кольца С хромофора одной молекулы и NH_3 -группой аминсахарного кольца другой молекулы показана пунктиром

Плоскости хромофоров молекул практически параллельны друг другу и расположены на расстоянии $\sim 0,34$ нм в обеих структурах. Аминсахарные кольца ориентированы приблизительно перпендикулярно к хромофорам. При этом для антипараллельной структуры комплекса наблюдается угол закручивания плоскостей хромофоров $\psi \approx 168^\circ$, а для параллельной $\psi \approx 15^\circ$. В параллельной структуре необходимо учитывать довольно сильное стерическое отталкивание боковых цепей в сравнении с антипараллельной ориентацией молекул в 1:1 комплексе.

В рассчитанных структурах димерных комплексов имеет место достаточно интенсивное перекрывание ароматических колец взаимодействующих молекул (стэкинг-взаимодействие), что предполагает существенную роль дисперсионных взаимодействий при образовании ассоциатов. Кроме того, расчетная структура 1:1 комплекса с антипараллельной ориентацией хромофоров предполагает возможность образования водородной связи между O12 атомом ароматического кольца С хромофора одной молекулы и NH_3 -группой аминсахарного кольца другой молекулы (рисунок 4).

Рассчитанные структуры комплексов отвечают как предельным протонным химическим сдвигам для этой молекулярной системы, так и минимуму ее потенциальной энергии, определенной методом молекулярного моделирования.

Таким образом, можно сделать вывод, что молекулы дауномицина способны образовывать два вида самоассоциатов в водном растворе – с параллельной и антипараллельной ориентацией хромофоров. Подобные исследования представляются важными для установления детального молекулярного механизма сиквенс-специфического связывания антиопухолевого антибиотика дауномицина с генетическим материалом клетки [7].

Библиографический список

1. Arcamone F. Antracyclines and Anthracenedione-based Anticancer Agents / F. Arcamone, S. Penco, In: Lown J.W. (Ed). — N.Y.: Elsevier, 1988 — 320 p.
2. Исследование самоассоциации молекул антрациклиновых антибиотиков в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии / Р.Дж. Итон, Д.А. Веселков, С.Ф. Барановский, С.Г. Осетров, Л.Н. Дымант, Д.Б. Дэвис, А.Н. Веселков // Хим. физика. — 2000. — Т. 19. — № 2. — С. 98–104.
3. Thermodynamic characterization of daunomycin - DNA interactions: microcalorimetric measurements of daunomycin-DNA binding enthalpies / D.P. Remetta, P. Mudd, K.L. Berger, K.J. Breslauer // Biochemistry. — 1991. — V. 30. — P. 9799–9809.
4. Chaires J.B. Self-association of Daunomycin / J.B. Chaires, N. Dattagupta, D.M. Crothers // Biochemistry. — 1982. — V. 21. — P. 3927–3932.
5. Thermodynamics of Drug - DNA Interactions / L.A. Marky, J.G. Snyder, D.P. Remetta, K.J. Breslauer // J. Biomol. Str. Dyn. — 1983. — V. 1. — P. 487–507.
6. Davies D.B. ^1H -NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution: structural and thermodynamical analysis / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1996. — V. 92. — P. 383–390.
7. Davies D.B. Structural and thermodynamical analysis of drug binding to single-stranded DNA oligomers / D.B. Davies, S.F. Baranovsky, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1997. — V. 93. — P. 1559–1572.
8. The protein data bank / H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne // Nucleic Acids Res. — 2000. — V. 28. — P. 235–242.

Поступила в редакцию 2.04.2004 г.