

УДК 577.32

К.А. Веселков, А.В. Семанин, Л.Н. Дымант, А.Н. Веселков

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ИНТЕРКАЛИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА ФЕНОКСАЗОНОВОГО
АНТИБИОТИКА АКТИНОЦИЛ-БИС-(2-ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛ)
АМИДА С ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДОМ 5'-d(T_pG_pC_pA)
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ 2М-ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ**

Представлены результаты расчетов пространственной структуры интеркалированного комплекса синтетического феноксазонового соединения актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида с самокомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCpA). Расчеты выполнены методами молекулярной механики с использованием данных двумерной ЯМР-спектроскопии, полученных для исследуемой молекулярной системы в водно-солевом растворе. Установлены конформационные особенности комплекса при связывании феноксазонового антибиотика с ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Многие противоопухолевые антибиотики проявляют свою цитотоксическую активность в результате специфического взаимодействия с ДНК, что приводит к генотоксическому стрессу и последующей инициации запрограммированной смерти клеток (апоптозу) [1]. Антибиотик актиномицин D (AMD) относится к подобным лекарственным препаратам и применяется при лечении определенных раковых заболеваний, в частности, при комбинированной химиотерапии сарком мягких тканей, лимфом и меланом [2]. При комплексообразовании AMD с ДНК плоский феноксазоновый хромофор антибиотика интеркалирует между азотистыми основаниями ДНК, а две циклические пентапептидные боковые цепи располагаются в малой канавке двойной спирали [3]. Значительная цитотоксическая активность AMD проявляется при концентрациях меньших 1 нМ, однако клиническое применение этого антибиотика ограничено из-за его высокой кардиотоксичности. С помощью направленного биосинтеза получено большое число различных производных и аналогов актиномицина, модификации подвергались как аминокислотный состав пептидных лактонных колец, так и структуры боковых цепей хромофора [4].

В [4,5] проведены систематические исследования синтетических феноксазоновых антибиотиков с аминоалкильными боковыми цепями разной длины и различными терминальными функциональными группами. Изуче-

ние индуцированного апоптоза и фаз клеточного цикла в лейкемических клетках человека методом проточной цитофлюориметрии показало, что изменение длины боковой аминоалкильной цепи в производных актиномицина D на одну метиленовую CH_2 группу ведет к значительной вариации антиопухолевой активности синтетических ароматических соединений [4,5]. Исследования термодинамики комплексообразования феноксазоновых соединений с ДНК методом дифференциальной сканирующей калориметрии коррелируют с данными цитофлюориметрии, а именно свидетельствуют о существенной зависимости сродства лигандов к связыванию с ДНК от длины аминоалкильных боковых цепей [5]. При этом экспериментальные данные однозначно показывают, что активность антибиотика актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида (Act II), содержащего аминоалкильную боковую цепь с двумя CH_2 группами, оказывается существенно выше, чем у исследованных феноксазоновых антибиотиков с другим количеством метиленовых групп в боковой цепи [4,5]. Следует отметить, что разработка антрациклиновой группы антиопухолевых лекарственных средств с аминоалкильными боковыми цепями привела к созданию нового синтетического антибиотика митоксантрона, обладающего улучшенными медико-биологическими свойствами (в частности, более низкой кардиотоксичностью) по сравнению с природными антрациклиновыми антиопухолевыми антибиотиками, такими, как доксорубин и дауномицин [6].

Для выяснения природы физических взаимодействий, ответственных за специфику комплексообразования ароматических лигандов с ДНК, необходимо иметь детальную информацию о пространственной структуре и энергетических характеристиках молекулярных комплексов. В настоящей работе изучено комплексообразование феноксазонового соединения Act II с дезокситетрануклеотидом d(TpGpCpAp). Экспериментальные исследования проведены методами двумерной 2D-TOCSY и 2D-NOESY ^1H -ЯМР спектроскопии. Результаты ЯМР-эксперимента использованы при расчете пространственной структуры комплекса антибиотика Act II с дезокситетрануклеотидом методами молекулярной механики. Следует отметить, что ранее была предложена структура данного комплекса на основании качественного анализа 2D-ЯМР спектров в водном растворе [7].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

а) Экспериментальная методика. Синтез антибиотика актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида (рисунок 1) проведен, как описано в [5], путем окисления производного ортоаминофенола парахиноном, образованным в результате каталитического гидрирования соответствующих амидов

2-нитро-3-бензилокси-4-метил-бензойной кислоты. Состав и строение полученного соединения подтверждены данными элементного анализа, наличием характеристических полос в ИК спектрах и характерного для феноксазонового хромофора поглощения в видимой области электронных спектров, а также данными 1М- и 2М- ^1H ЯМР спектров. Дезокситетранрибонуклеотид d(TrGpCrAp) синтезирован компанией «Oswel DNA Service» (Великобритания). Act II и тетрамер лиофилизovali из D_2O с изотопной чистотой 99,95% D (“Sigma”) и растворяли в водно-солевом растворе (0.1 M NaCl), содержащем 10^{-4} моль/л EDTA.

Двумерные ^1H -ЯМР спектры 2М-TOCSY и 2М-NOESY измерены на импульсном спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц при различных соотношениях концентраций лиганда и дезокситетрануклеотида в водно-солевом растворе. Спектры 2М-TOCSY измеряли при температуре 300 K, используя 2048 точек в период детектирования (t_2) и 256 приращений времен эволюции (t_1) при времени смешивания $\tau_m = 70$ мс. При проведении 2М-NOESY эксперимента ($T = 300\text{K}$) использовали стандартную последовательность импульсов при ширине спектров $\text{SW} = 6000$ Гц, 4096 точек в t_2 , 512 в t_1 и при двух временах смешивания $\tau_{m1} = 90$ мс и $\tau_{m2} = 200$ мс. Период восстановления составлял 1,5 с и 3,0 с для 2М-TOCSY и 2М-NOESY соответственно. Для увеличения чувствительности импульсную последовательность при каждом t_1 повторяли 16 раз для 2М-TOCSY и 32 раза для 2М-NOESY. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2 диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромид тетраметиламмония). Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли BVT-терморегулятором. Отнесение сигналов необменивающихся протонов дезокситетрануклеотида

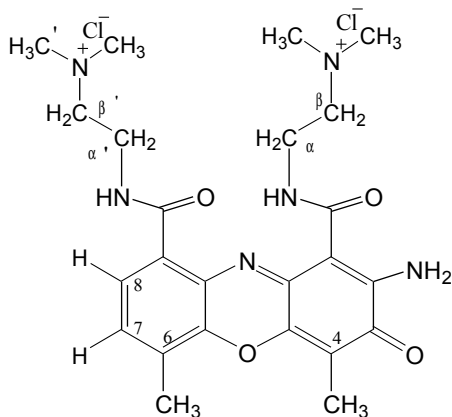


Рисунок 1 – Структурная формула феноксазонового соединения актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида

5'-d(TpGpCpA) в водно-солевом растворе (0.1M NaCl), полученное на основе данных 2M-TOCSY и 2M-NOESY ЯМР-спектроскопии, хорошо согласуется с определенным ранее в 0.1 M фосфатном буфере [4]. Отождествление сигналов в ^1H ЯМР спектрах смешанного раствора ActII-DNA получено в [7] путем анализа двумерных спектров 2M-TOCSY и 2M-NOESY экспериментов.

б) Расчетная методика. Расчет пространственной структуры интеркаляционного комплекса дезокситетрануклеотида d(TpGpCpA) с Act II выполнен методами молекулярной механики с помощью программы X-PLOR (версия 3.851). Стартовые структуры комплекса для расчетов получали с помощью процедур X-PLOR путем встраивания лиганда между парами азотистых оснований в d(TpG)-сайт тетрамерного дуплекса, находящегося в конформации, соответствующей классической В-форме ДНК. Каждая олигонуклеотидная цепь терминировалась с 5' и 3'-концов OH-группой. Энергии взаимодействия атомов олигонуклеотида рассчитывались с использованием параметрической системы Charmm22. Пространственная геометрия антибиотика Act II была получена на основе данных кристаллографических исследований для производного актиномицина D [8]. Топология молекулы Act II и параметризация атомных взаимодействий в молекуле разработана с помощью программы XPLO2D с соответствующей корректировкой силовых констант. При этом использованы данные по распределению электрических зарядов в антибиотике Act II, предоставленные проф. Полтевым В.И. (ИТЭБ РАН). Учтено, что в водно-солевом растворе молекула Act II имеет положительный заряд, равный двум элементарным зарядам, которые локализованы на аминоалкильных цепях в области терминирующих их атомных групп. Водное окружение интеркаляционного комплекса моделировали 1100 молекулами воды TIP3P, размещенными в прямоугольном боксе. Нейтрализация избыточных электрических зарядов фосфатов в дуплексе тетрамера обеспечивалась ионами Na^+ , находящимися в стартовых конфигурациях вблизи атомов фосфора на расстояниях 4.5–6 Å вдоль биссектрис углов O-P-O. Оптимизация геометрии октамера осуществлялась средствами программы X-PLOR путем минимизации потенциальной энергии системы, а также с использованием процедуры “отжига” от высокой (600–700 K) до комнатной температуры $T=300\text{ K}$. Минимизация и “отжиг” выполнялись многократно с различных стартовых позиций, полученных в процессе молекулярной динамики на различных участках траектории. Конформационные параметры тетрануклеотидного дуплекса определялись на основе программы FREEHELIX. Визуализация расчетных молекулярных структур выполнялась с помощью программного средства VMD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованных 2М–NOESY спектрах (рисунки 2,3) наблюдается довольно большое количество межмолекулярных кросс-пиков между необменивающимися протонами нуклеотидов d(TrpG)-сайта и протонами как хромофора Act II, так и его боковых цепей (таблица 1). Существенно, что

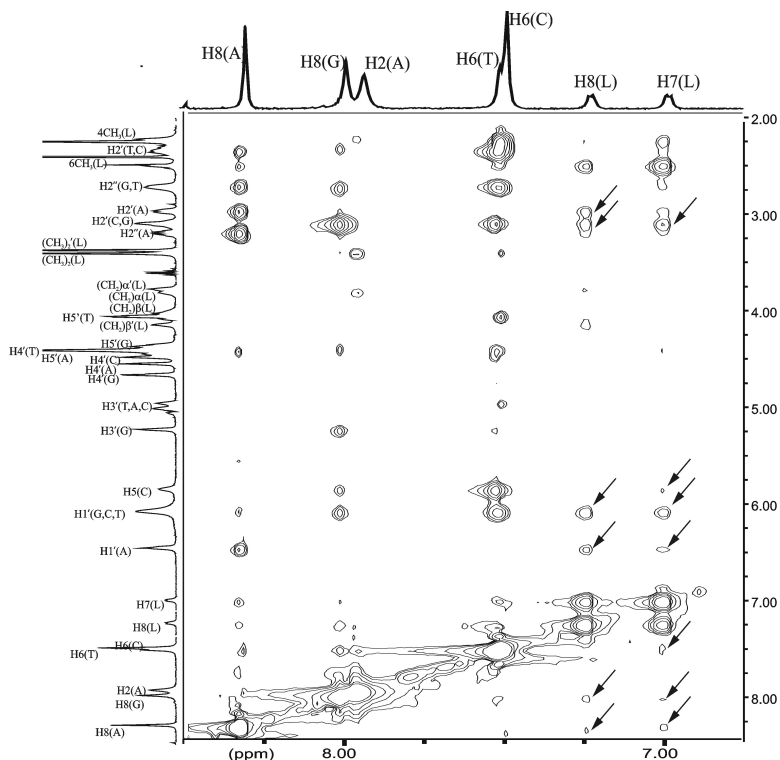


Рисунок 2 – Расширение контурного 2М-NOESY спектра (500 МГц, $\tau_m = 200$ мс) раствора ActII с 5'-d(TrpGrpCrA) при $C_{\text{ActII}} = 1$ ммоль/л, $C_{\text{ТГСА}} = 2$ ммоль/л, $T = 300$ К, в котором приведены корреляции (указаны стрелками) между протонами хромофора ActII и нуклеотидов ЛНК

кросс-пики проявляются при различных соотношениях концентраций взаимодействующих молекул и временах смешивания в 2М–NOE-эксперименте. Последнее с учетом малых значений времен смешивания в данном ЯМР-эксперименте свидетельствует об отсутствии заметной спиновой диффузии в исследуемой молекулярной системе.

Анализ кросс-пиков NOE позволяет сделать заключение, что феноксазоновый антибиотик ActII преимущественно взаимодействует с терминальным d(TG)-сайтом дуплекса дезокситетрануклеотида. Видно при этом, что возможны две взаимно противоположные ориентации асимметричного хромофора антибиотика в месте интеркаляции, при которых бензольное кольцо хромофора обращено либо к 5'- или же к 3'- концу сахара-фосфатной цепи. Следует отметить, что аналогичный вывод о двух различных ориентациях феноксазонового хромофора был сделан ранее при исследовании комплексообразования антиопухолевого антибиотика актиномицина D с самокомплементарными олигонуклеотидами различной длины и последовательности оснований в цепи. Известно, что феноксазоновый антибиотик актиномицин D пре-

имущественно связывается с GC-сайтами полимерной ДНК и достаточно длинных дезоксиолигонуклеотидов [3]. Использование в данной работе короткого фрагмента ДНК, дезокситетрануклеотида 5'-d(TGCA), по-видимому, сказывается на специфике связывания феноксазонового соединения ActII, поскольку терминальный сайт тетрамера легче раскрывается для встраивания хромофора ароматического лиганда. Наличие межмолекулярных контактов между протонами боковых аминокислотных цепей антибиотика и протонами дезоксирибозы на участке интеркаляции (рисунки 2,3 и таблица 1) свидетельствует о том, что ActII интеркалирует в дезокситетрануклеотид со стороны малой канавки двухспирального дуплекса. При этом возможна дополнительная стабилизация молекулярного комплекса за счет электро-

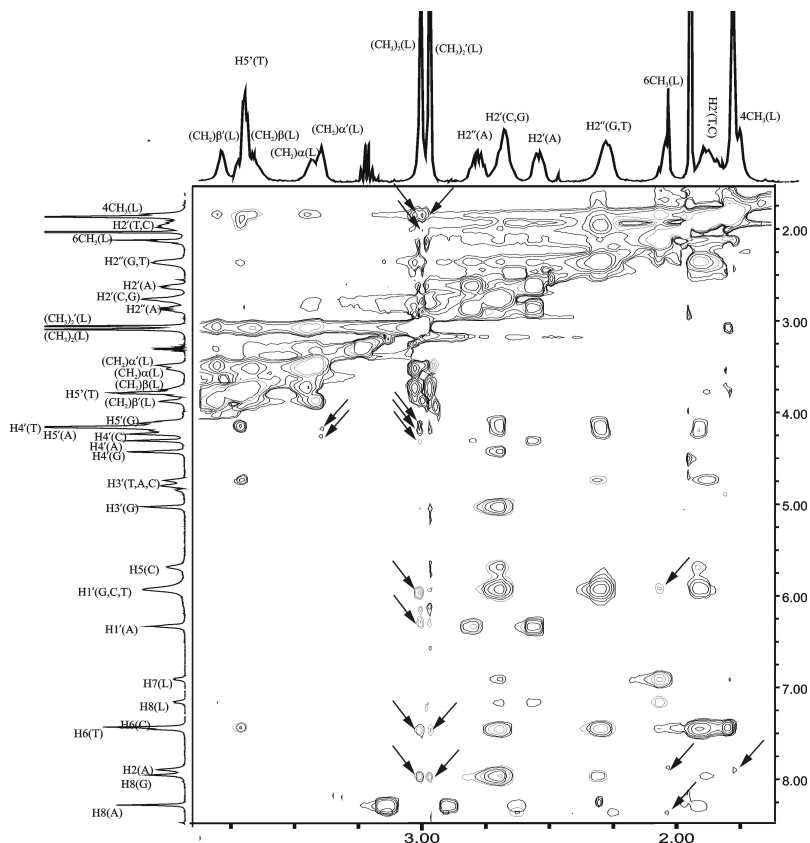


Рисунок 3 – Расширение контурного 2М-NOESY спектра (500 МГц, $\tau_m = 200$ мс) раствора ActII с 5'-d(TrGrCpA) при $C_{\text{ActII}} = 1$ ммоль/л, $C_{\text{TGCA}} = 2$ ммоль/л, $T = 300\text{K}$, в котором приведены корреляции (указаны стрелками) между протонами боковых цепей ActII и нуклеотидов ДНК

Таблица 1 – NOE-контакты между необменивающимися протонами дез-окситетрануклеотида 5'-d(TpGpCpA) и актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида (ActII)

контакт	интенсивность	контакт	интенсивность
H7(L) · H8(A)	S ^{*)}	6CH ₃ (L) · H1' (T)	M
H7(L) · H8(G)	S	CH ₂ α' (L) · H4' (C)	M
H7(L) · C(H5)	S	CH ₂ α' (L) · H4' (T)	M
H7(L) · H1' (A)	M	(CH ₃) ₂ (L) · H4' (G)	S
H7(L) · H2' (G)	M	(CH ₃) ₂ (L) · H4' (A)	S
H7(L) · H1' (T)	M	(CH ₃) ₂ (L) · H4' (C)	S
H7(L) · H6(T)	M	(CH ₃) ₂ (L) · H4' (T)	S
H8(L) · H8(A)	S	(CH ₃) ₂ (L) · H2' (T)	S
H8(L) · H8(G)	M	(CH ₃) ₂ (L) · H1' (A)	S
H8(L) · H1' (A)	M	(CH ₃) ₂ (L) · H1' (G)	S
H8(L) · H2' (A)	M	(CH ₃) ₂ (L) · T(H6)	S
H8(L) · H2' (G)	S	(CH ₃) ₂ (L) · H2(A)	S
H8(L) · H1' (G)	M	5CH ₃ · (CH ₃) ₂ (L)	S
4CH ₃ (L) · H2(A)	S	(CH ₃) ₂ ' (L) · H2' (C)	S
6CH ₃ (L) · H2(A)	S	(CH ₃) ₂ ' (L) · C(H6)	S
6CH ₃ (L) · H8(A)	S	(CH ₃) ₂ ' (L) · H8(G)	S

^{*)} S, M – кросс-пики малой и средней интенсивности соответственно

Следует отметить, что анализ 2M-NOESY спектров позволяет получить количественную информацию о структуре молекулярных комплексов в растворе, поскольку интенсивности внутри- и межмолекулярных NOE-контактов однозначно связаны с расстоянием между взаимодействующими ядрами. Вместе с тем, использование известных соотношений между интенсивностями кросс-пигов NOE и расстояниями между взаимодействующими протонами связано с предположением об одинаковых величинах времен релаксации ядер в исследуемых молекулах. В случае комплекса лиганд – ДНК отсутствие надежных данных о временах корреляции для протонов ароматического лиганда и его комплекса с ДНК не позволяет, строго говоря, провести корректный расчет значений межпротонных расстояний. В то же время сравнительный анализ интенсивностей межмолекулярных кросс-пигов дает возможность сделать определенное заключение о соотношении расстояний между протонами ароматического лиганда и фрагмента ДНК. В настоящей работе все имеющиеся NOE-контакты разделены на два класса – средние (M) и слабые (S) (таблица 1), что примерно отвечает диапазонам межпротонных расстояний $2,6 \div 3,5 \text{ \AA}$ и $3,6 \div 5,0 \text{ \AA}$, соответственно.

Установленные на основе 2М-ЯМР эксперимента характерные особенности интеркалированного комплекса ActII с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) использованы при расчете его пространственной структуры. Отбор структур при моделировании исследуемой молекулярной системы проводился с учетом межпротонных расстояний, полученных в ЯМР-эксперименте. Следует отметить, что в целом наблюдается хорошая сходимость результатов, т.е. структуры интеркалированного комплекса, получаемые с различных

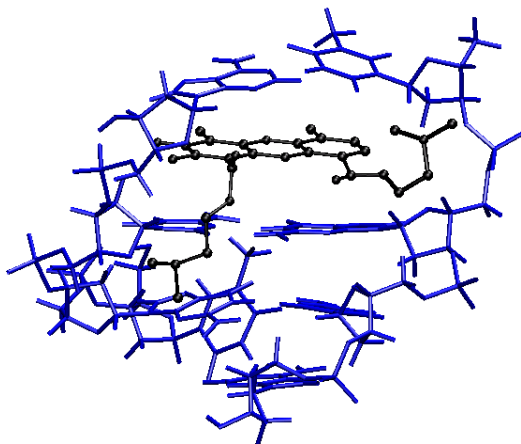


Рисунок 4 – Расчетная пространственная структура интеркаляционного комплекса феноксазонового антибиотика ActII с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA)

стартовых конфигураций, близки по конформационным параметрам. На рисунке 4 представлена расчетная пространственная структура комплекса, соответствующая одной из двух возможных ориентаций хромофора антибиотика в сайте интеркаляции. Структура отвечает минимальному значению потенциальной энергии системы и удовлетворяет экспериментальным данным ЯМР по межпротонным расстояниям.

Характерно, что боковые аминокислотные цепи антибиотика, которые в свободном состоянии располагаются вблизи плоскости хромофора, в комплексе с фрагментом ДНК испытывают конформационные изменения, укладываясь в малой канавке двуспирального дуплекса по разные стороны от хромофора в направлениях 5'-концов обеих комплементарных нитей. Положительно заряженный атом азота терминальной $N(CH_3)_2$ группы цепи, прикрепленной к бензольному кольцу хромофора (рисунок 1, атомы этой цепи штрихованы), располагается вблизи фосфатной группы гуанина G2 – расстояние между атомами N и P составляет около 4 Å. Соответствующий атом азота другой боковой цепи (не штрихованной) располагается примерно на таком же расстоянии от атома O4' дезоксирибозного кольца цитозина C3. Хромофор лиганда ориентирован в сайте интеркаляции так, что его продольная ось расположена примерно симметрично относительно продольных осей верхней и нижней пар азотистых оснований, при этом имеет место значительное перекрытие ароматических колец антибиотика и азотистых оснований обеих пар (рисунок 5).

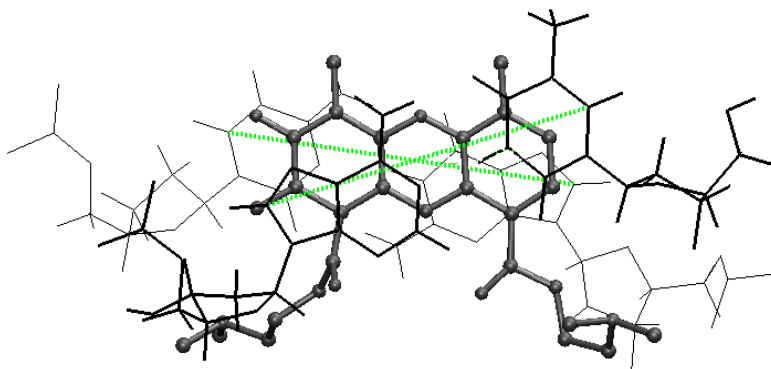


Рисунок 5 – Вид на участок интеркаляции сверху; хромофор антибиотика ActII выделен жирными линиями, пунктирными линиями показаны продольные оси верхней (Т-А) и нижней (G-С) пар азотистых оснований

Встраивание антибиотика в дуплекс существенно изменяет конформационные параметры динуклеотидного участка в месте интеркаляции. Среднее расстояние между парами оснований D_z здесь составляет 7,05 Å, смещение пар относительно друг друга вдоль их длинной (D_y) и короткой (D_x) осей равно 2 Å и 1 Å, соответственно. Наблюдается характерное для интеркаляционного связывания лиганда с ДНК раскручивание спирали, составляющее здесь примерно 11° , т.е. угол спирального вращения $\Omega = 25^\circ$. Следует при этом отметить, что предварительные расчеты пространственной структуры комплекса 5'-d(TpGrCpA) с ActII для случая противоположной ориентации хромофора антибиотика в месте интеркаляционного связывания лиганда свидетельствует о существенно большей раскрутке спирали, так что продольные оси верхней и нижней пар азотистых оснований оказываются практически параллельными. Интересно, что в кристаллическом комплексе олигонуклеотида с актиномицином D угол Ω на участке связывания антибиотика составляет примерно три градуса [3].

В расчетной структуре комплекса ActII + 5'-d(TpGrCpA) (рисунок 4) угол пропеллера терминальной пары Т-А имеет достаточно большое положительное значение ($\omega = 14,5^\circ$), при этом наблюдается существенное раскрытие двух пар Т-А и G-С в участке интеркаляции в сторону большой канавки дуплекса ($\rho = -13,5^\circ$), что не характерно для регулярной спирали ДНК в водно-солевом растворе. Такие особенности структуры динуклеотидного участка в месте связывания лиганда коррелируют со значениями фазового угла псевдовращения P , характеризующего конформацию дезоксирибозных остатков. Угол P равен 87° для звена G2 первой нити и 12° для T1 другой нити, что характерно для O4'-эндо и O3'-эндо конформаций дезоксирибозы. В то же время все остальные нуклеотидные звенья характеризуются ве-

личинами фазового угла псевдовращения P в пределах 155° – 162° , что соответствует $C2'$ -эндо конформации сахарных колец, т.е. В-форме ДНК. Очевидно, с изменениями конформации дезоксирибозы связаны и вариации значений торсионных углов β и γ сахаро-фосфатного остова, характеризующих вращение вокруг связей $O5'-C5'$ и $C5'-C4'$. Нуклеотид G2 первой нити дуплекса имеет угол β в области *+синклиальной*, а угол γ – в области *антиперипланарной*, в то время как у остальных нуклеотидов эти углы примерно одинаковы и близки к значениям, наблюдаемым в В-форме ДНК. Величина гликозидного угла χ во всех нуклеотидных звеньях дуплекса находится в пределах 235° – 269° , т.е. азотистые основания всегда располагаются в антиконформации по отношению к сахарному кольцу. Отметим, что такой вывод можно сделать также непосредственно из анализа 2М-NOESY спектра раствора дезокситетрануклеотида с ActII (рисунки 2, 3), где наблюдаются довольно интенсивные кросс-пики между протонами H8(pur)/H6(pyr) азотистых оснований и протонами H2' связанных с ними сахарных колец при сравнительно слабых корреляциях между протонами H8/H6 и H1'. Сигналы NOE между протонами сахаров H1' и H2'' оказываются в большинстве случаев более интенсивными по сравнению с кросс-пиками H1' и H2', что свидетельствует о преимущественной S-конформации ($C2'$ -эндо) дезоксирибозных остатков в олигонуклеотидной цепи.

Таким образом, проведенный детальный анализ комплексообразования синтетического феноксазонового соединения ActII с фрагментом ДНК, дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGrCrA), позволяет сделать определенные выводы о природе физических взаимодействий и специфике формирования пространственной структуры интеркалированного комплекса. Сравнение характерных особенностей структур комплексов ДНК с производными антибиотика актиномицина D, содержащими различное число метиленовых групп в аминокатильных боковых цепях, позволяет выяснить молекулярный механизм наблюдаемой корреляции между длиной боковых цепей и биологической активностью феноксазоновых соединений.

Библиографический список

1. Chresta C.M. Apoptosis and cancer chemotherapy / C.M. Chresta, E.L. Arriola, J.A. Hickman // Behring Inst. Mitt. — 1996. — V. 36. — P. 232–236.
2. Farber S.J. Chemotherapy in the treatment of leukemia and Wilm's tumor / S.J. Farber // J. Am. Med. Assoc. — 1996. — V. 198. — P. 826–836.
3. Structural, physical and biological characteristics of RNA:DNA binding agent actinomycin D / M. Shinomiya, W. Chu, R.G. Carlson, R.F. Weaver, F. Takusagava // Biochemistry. — 1995. — V. 34. — P. 8481–8491.
4. Veselkov A.N. Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. — Sevastopol: SevNTU press, 2002. — 259 p.

5. Structure-activity relation for synthetic phenoxazone drugs / A.N. Veselkov, V.Ya. Maleev, E.N. Glibin, L. Karawajev, D.B. Davies // Eur. J. Biochem. — 2003. — V. 270. — P. 1–8.

6. Denny W.A. Kinetics of the binding of mitoxantrone, ametantrone and analogues to DNA: relationship with binding mode and anti-tumour activity / W.A. Denny, L.P.G. Wakelin // Anti-Cancer Drug Des. — 1990. — V. 5. — P. 189–200.

7. 2М ¹Н-ЯМР анализ комплексообразования феноксазонового антибиотика актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TrGpCpA) в водном растворе / А.Н. Веселков, Р.Дж. Итон, А.О. Лантушенко, О.В. Рогова, А. Эрнандес Сантьяго, Д.Б. Дэвис // Биополимер. клетка. — 1993. — № 6. — С. 546–552.

8. Coles S.J. EPSRC National Crystallography Service, University of Southampton. / S.J. Coles // N 03SRC0359. — 2004.

Поступила в редакцию 26.04.2004 г.