



Биолог. журн. Армении, 4 (70), 2018

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА И НЕТРОПСИНА С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

С.Н. АКОПЯН¹, Р.С. КАЗАРЯН², М.А. ШАГИНЯН³, С.А. САРКИСЯН⁴,
Ю.С. БАБАЯН⁴

¹Национальный политехнический университет Армении, кафедра машиноведения,

²Ереванский госуниверситет, кафедра молекулярной физики,

³Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики,

⁴Национальный университет архитектуры и строительства Армении,
кафедра физики и электротехники
babayanyura@gmail.com

Показано, что при помощи спектрофотометрически полученных изотерм адсорбции можно определить термодинамические параметры (свободная энергия, энтальпия и энтропия) связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами (НК). Показано также, что с большой точностью (разница в значениях не более 5%) энтальпию связывания можно определить из изотерм адсорбции.

Согласно расчетам, исследованные лиганды (доксорубицин и нетропсин) с В-формой НК образуют более прочные комплексы, чем с А-формой.

Двухспиральная нуклеиновая кислота – доксорубицин – нетропсин – изотерма связывания – энтальпия

Ցույց է տրվել, որ սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով ստացված կապման կորերի օգնությամբ կարելի է որոշել Նուկլեինաթթուների (ՆԹ) հետ լիգանդների կապման թերմոդինամիկ պարամետրերը (ազատ էներգիա, էնթալպիա և էնթրոպիա): Ցույց է տրված, որ կապման էնթալպիան ավելի մեծ ճշգրտությամբ (արժեքների տարբերությունը 5 %-ից բարձր չէ) կարելի է որոշել կապման կորերից:

Համաձայն հաշվարկների, հետազոտված լիգանդները (դոքսորուբինը և նետրոպսինը) ՆԹ-ի В-ձևի հետ ավելի ամուր կոմպլեքսներ են առաջացնում, քան А-ձևի հետ:

Երկսպիրուլյր Նուկլեինաթթու – դոքսորուբին – նետրոպսին – կապման կոր – էնթալպիա

It was shown that the binding thermodynamic parameters (free energy, enthalpy and entropy) of ligands to nucleic acids (NA) may be determined through the spectrophotometrically obtained adsorption isotherms. It was shown that the binding enthalpy can be determined with higher precision (difference in values not more than 5%) from the adsorption isotherms.

Calculations showed that the studied ligands (doxorubicin and netropsin) form tighter complex with B-form NA, than with A-form.

Double helical nucleic acid – doxorubicin – netropsin – adsorption isotherm – enthalpy

При связывании нуклеиновых кислот (НК) с лигандами изменяются термодинамические параметры, описывающие систему НК-лиганд. Очень часто для

выяснения молекулярных механизмов комплексообразования необходимо знать термодинамические параметры (свободная энергия, энтальпия, энтропия и т.д.) связывания. Термодинамические параметры связывания обычно определяют изотермической микрокалориметрией [5, 7]. Определение термодинамических параметров связывания при помощи изотермической микрокалориметрии связано с определенными трудностями: при измерениях используется НК в больших концентрациях (приблизительно 10^{-2} М/Р). Вследствие большой концентрации НК и соответственно лигандов, при смешивании образуются пузырьки, агрегационные процессы и т.д., которые в большей степени влияют на значения экспериментально измеренной величины [4, 6]. Поэтому в процессе измерения теплоты ошибка, связанная с этими явлениями, составляет не менее 5 % от эффекта [5, 7]. Следовательно, предпочтительно термодинамические параметры связывания определить при помощи, более простой, например, спектрофотометрических измерений, которые легче и просто экспериментально реализовать, где концентрации НК, используемые при измерениях, почти на три порядка меньше ($\sim 10^{-5}$ М/Р), чем в калориметрических измерениях, и косвенные нежелательные явления (образование пузырьков, агрегатов и т.д.) почти не возникают [2, 4].

В данной работе по спектрофотометрически полученным изотермам адсорбции определены термодинамические параметры связывания интеркалирующих (доксорубицин) и неинтеркалирующих (нетропсин) лигандов с А- и В-конформациями двуспиральных НК.

Материал и методика. Спектрофотометрическое титрование водных растворов доксорубицина (ДХ) и нетропсина (Nt) с растворами двуспиральных НК проводилось на спектрофотометрах PYE UNICAM SP8-100 (Англия) и CARY-219 (США), что подробно написано в работах [2-4]. Связывание ДХ и Nt с ДНК тимуса телят и двуспиральным синтетическим полирибонуклеотидом poly(A)-poly(U) исследовалось в водном растворе, содержащем 0,1М NaCl и 0,01М буфер Трис, pH 7,4. Концентрация ДНК, poly(A)-poly(U), ДХ и Nt были определены спектрофотометрически, используя следующие значения коэффициента экстинкции, $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК тимуса телят; $\epsilon_{260}=7140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(A)-poly(U), для лигандов в мономерном состоянии – $\epsilon_{480}=11500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДХ и $\epsilon_{296}=21500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Nt. Все препараты фирмы “Sigma” использовались без дополнительной очистки.

Результаты и обсуждение. ДХ является антрациклиновым противоопухолевым антибиотиком. Проникая в клетку, молекулы ДХ связываются с ДНК, чем и обусловлен их противоопухолевый эффект [8,15,16]. Показано, что связывание ДХ происходит в основном интеркалирующим способом и через желобок двойной спирали НК [16]. Было изучено поведение изменения спектров поглощения ДХ в видимой области, обусловленное взаимодействием двуспиральных НК с ДХ. Поскольку в видимой области спектра НК не поглощает, изменение спектров поглощения ДХ в видимой области спектра обусловлено только комплексообразованием с НК. Из рис. 1, где показаны спектры поглощения комплексов ДНК с ДХ, следует, что при добавлении ДНК в раствор ДХ (при постоянной концентрации ДХ) наблюдается гипохромизм и сдвиг максимума кривой в длинноволновую область. Характер изменения спектров поглощения (рис.1) показывает, что наблюдается в основном интеркаляционное связывание (гипохромизм и красный сдвиг). Как следует из рис.1, при исследованной температуре и ионной силе на спектрах поглощения четко выявляется изобестическая точка с длиной волны 538 нм, которая остается неизменной до полного связывания ДХ с ДНК.

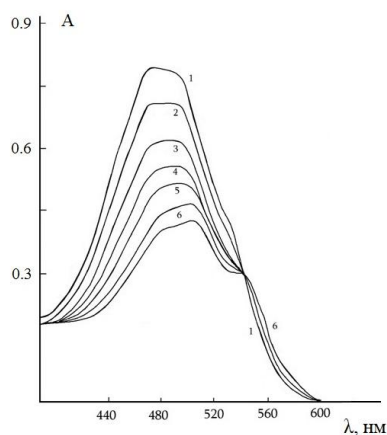


Рис. 1. Изменение спектров поглощения доксорубина при связывании с ДНК тимуса теленка в буфере при 20⁰С. В процессе титрования концентрация доксорубина остается постоянной ($C_0=6.62 \cdot 10^{-5}$ М, спектр 1). Концентрация ДНК меняется от нуля (1) до 10^{-4} М/Р (6).

Следовательно, при указанных внешних условиях наблюдается только один тип связанного состояния ДХ-ДНК, различимый по спектрам спектрофотометрического титрования. Вполне возможно, судя по характеру изменения спектров поглощения, этот тип связывания является интеркаляционным. Следовательно, при данных внешних условиях наблюдается только интеркаляционное связывание молекул ДХ. Из экспериментальных данных следует, что, начиная с определенного значения относительной концентрации C_0/C_p (где C_p -концентрация НК, а C_0 -молярная концентрация ДХ в растворе), спектры поглощения комплексов ДХ-ДНК в видимой области спектра перестают изменяться, что означает, что все молекулы ДХ в растворе находятся в связанном состоянии. Аналогичным образом были исследованы взаимодействие ДХ с poly(A)·poly(U). Опыты показывают, что характер изменения спектров поглощения при титровании почти одинаковы для двуспиральных НК. В тоже время из спектров поглощения комплексов ДХ-poly(A)·poly(U) следует, что ДХ с poly(A)·poly(U) (А-формой) в исследуемых внешних условиях взаимодействует только интеркалирующим способом.

Исследовано также связывание неинтеркалирующего лиганда Nt с ДНК и poly(A)·poly(U). Nt является более или менее линейной молекулой, несущей положительный заряд на двух концах молекулы. Он проявляет АТ-специфичность при связывании с ДНК и располагается в узком бороздке ДНК, образуя упорядоченный комплекс [10, 11, 13]. Экспериментальные данные (спектры поглощения комплексов Nt-НК) показывают, что Nt в исследованных внешних условиях связывается с НК только одним способом (ложится в узком желобке) [10, 13].

Из спектров поглощения (рис.1) определены концентрации свободного (C_f) и связанного (C_b) лигандов в растворе и построены изотермы связывания по методу, подробно описанному в работах [3, 4, 17]. Изотермы связывания описываются формулой (1), которая более точно описывает адсорбцию лигандов с НК, когда учитывается взаимодействие лигандов друг с другом.

$$\frac{r}{C_f} = K(1-nr) \left[\frac{(2\omega-1)(1-nr) + r - R}{2(\omega-1)(1-nr)} \right]^{n-1} \cdot \left[\frac{1-(n+1)r + R}{2(1-nr)} \right]^2 \quad (1)$$

где $R = \{[1-(n+1)r]^2 + 4\omega r(1-nr)\}^{1/2}$; $r = \frac{C_b}{C_p}$; K – константа связывания лиган-

да; n – параметр, характеризующий стехиометрию комплекса НК-лиганд при насыщении и равный числу пар оснований НК, занимаемой одной связанной молекулой лиганда; ω – параметр антикооперативности. На рис.2 и 3 приведены изотермы адсорбции ДХ и Nt с poly(A)-poly(U) при температурах 20⁰, 30⁰ и 40⁰С. Аналогичные кривые получены и при связывании этих лигандов с ДНК тимуса теленка. Значение параметров K , n и ω для комплексов ДХ и Nt с ДНК (В-формой) и синтетическим двуспиральным полирибонуклеотидом poly(A)-poly(U) (А-формой) при разных температурах, рассчитанные по формуле (1), приведены в табл.1. Как следует из табл. 1, ДХ и Nt с В-формой (ДНК тимуса теленка) образуют более прочный комплекс, чем с А-формой (с poly(A)-poly(U)). Константа связывания интеркалирующего лиганда ДХ с В-формой почти на порядок больше, чем K ДХ с А-формой, а K неинтеркалирующего лиганда Nt с В-формой почти в 4 раза больше, чем K Nt с А-формой. Одновременно, как следует из табл. 1, для обоих лигандов наблюдается антикооперативность ($\omega < 1$), которая более выражена для молекул ДХ. Следовательно, интеркалирующие (ДХ) и неинтеркалирующие (Nt) лиганды с более гидратированной В-формой образуют более прочный комплекс.

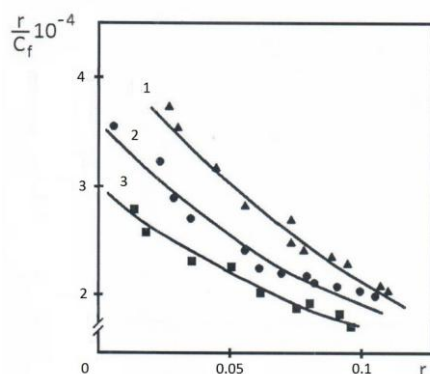


Рис. 2. Изотермы связывания в координатах Скэтчарда, построенные с помощью спектрофотометрического титрования доксорубина с poly(A)-poly(U) при температурах 20⁰С (1); 30⁰С (2) и 40⁰С (3).

Изменение термодинамических параметров вследствие связывания определены из анализа Ван-Гоффа. Изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) при образовании комплексов можно определить по формуле (2)

$$\Delta G = -RT \ln K(T) \quad (2)$$

Учитывая, что связь между ΔG , изменением энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) вследствие связывания выражается формулой (3),

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (3)$$

после преобразования из (2) и (3) имеем;

$$\ln K(T) = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

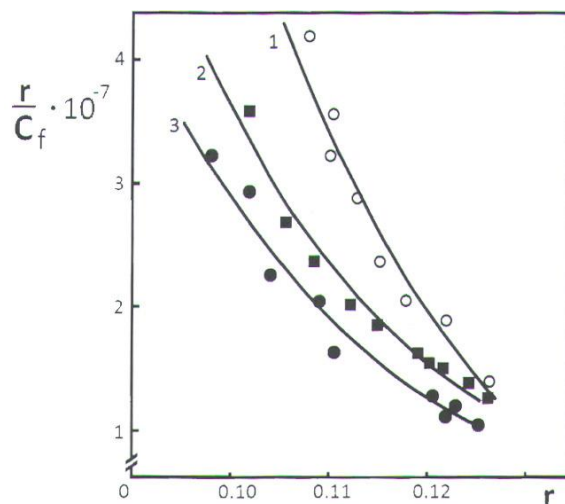


Рис. 3. Изотермы связывания, построенные с помощью спектрофотометрического титрования нетропсина с poly(A)·poly(U) при температурах 20°C (1); 30°C (2) и 40°C (3).

Согласно формуле (4), тангенс угла наклона $\ln K$ от T^{-1} дает величину $\Delta H \cdot R^{-1}$, если зависимость линейная, а ордината пересечения прямой с осью ординат $\Delta S \cdot R^{-1}$. По значениям $k(T)$ (табл. 1) была построена зависимость $\ln K(T)$ от T^{-1} (рис. 4). По этим точкам методом наименьших квадратов была проведена прямая линия и определены значения ΔH и ΔS для НК·ДХ и НК·Nt комплексов (табл. 1). Как следует из табл. 1, при образовании комплексов ДНК·ДХ и poly(A)·poly(U)-ДХ $\Delta H \cong -2.5$ ккал/моль для обоих комплексов. Однако ΔS больше при комплексообразовании с В-формой (17,4 кал/моль·К), чем с А-формой (12,8 кал/моль·К). Следовательно, при связывании интеркалирующего соединения ДХ с В-формой конформационных изменений комплексов больше, чем при связывании ДХ с менее гидратированной А-формой. Отметим, что для энтальпии связывания НК с интеркаляторами, содержащими большие боковые группы (например, ДХ и митоксантрон), микрокалориметрически получены значения $\Delta H \cong -(2 \div 3)$ ккал/моль [1,9], которые очень хорошо совпадают со значением ΔH , полученным нами спектрофотометрически.

Аналогичные результаты (табл. 1) получаются и при связывании неинтеркалирующего соединения Nt с НК. ΔH для обоих комплексов, в пределах ошибки измерения равны (для ДНК-Nt комплексов $\Delta H \cong -8.9$ ккал/моль, для poly(A)·poly(U)-Nt комплексов $\Delta H \cong -9.2$ ккал/моль), ΔS отличаются незначительно: связывание Nt с А-конформацией приводит к меньшему изменению ΔS по сравнению со взаимодействием с В-конформацией.

Таблица 1. Значения константы связывания (K), стехиометрия насыщения (n), параметр антикооперативности (ω) и термодинамические параметры связывания, определенные для комплексов ДНК и poly(A)-poly(U) с ДХ и Nt при 0.11 М NaCl.

Тип комплекса	t, °C	K, M ⁻¹	n	ω	$-\Delta G$ ккал/моль	$-\Delta H$ ккал/моль	ΔS кал/моль·K
ДНК-ДХ	20	$(5.6 \pm 0.2) \cdot 10^5$	4.0 ± 0.1	0.40 ± 0.02	7.76 ± 0.02	2.6 ± 0.2	17.4 ± 0.2
	30	$(4.9 \pm 0.1) \cdot 10^5$	4.1 ± 0.2	0.39 ± 0.03	7.94 ± 0.02		
	40	$(4.2 \pm 0.2) \cdot 10^5$	4.0 ± 0.1	0.42 ± 0.03	8.11 ± 0.02		
ДНК-Nt	20	$(5.0 \pm 0.2) \cdot 10^8$	6.0 ± 0.1	0.48 ± 0.04	11.74 ± 0.02	8.9 ± 0.3	9.8 ± 0.2
	30	$(3.0 \pm 0.2) \cdot 10^8$	5.9 ± 0.2	0.47 ± 0.05	11.83 ± 0.02		
	40	$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^8$	6.0 ± 0.2	0.49 ± 0.03	11.93 ± 0.02		
Poly(A)-poly(U)-ДХ	20	$(4.3 \pm 0.2) \cdot 10^4$	6.0 ± 0.3	0.38 ± 0.04	6.25 ± 0.02	2.5 ± 0.2	12.8 ± 0.3
	30	$(3.7 \pm 0.3) \cdot 10^4$	6.1 ± 0.2	0.41 ± 0.03	6.37 ± 0.02		
	40	$(3.3 \pm 0.2) \cdot 10^4$	6.0 ± 0.2	0.40 ± 0.02	6.51 ± 0.02		
Poly(A)-poly(U)-Nt	20	$(12.0 \pm 0.2) \cdot 10^7$	8.0 ± 0.2	0.49 ± 0.02	10.90 ± 0.02	9.2 ± 0.4	9.1 ± 0.2
	30	$(7.2 \pm 0.3) \cdot 10^7$	8.1 ± 0.1	0.52 ± 0.02	10.96 ± 0.02		
	40	$(4.4 \pm 0.2) \cdot 10^7$	8.0 ± 0.2	0.51 ± 0.02	11.02 ± 0.03		

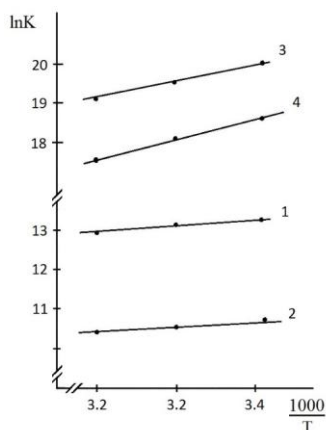


Рис. 4. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ определенных из изотерм адсорбции для комплексов ДНК-ДХ (1); poly(A)-poly(U)-ДХ (2); ДНК-Nt (3) и poly(A)-poly(U)-Nt (4).

Из литературных данных следует, что для ДНК-Nt комплексов методом изотермической микрокалориметрии при 25⁰C получены значения $\Delta H \cong -9.2$ ккал/моль [12,14], что согласуется с нашими данными. Следовательно, спектрофотометрически полученные значения энтальпии связывания для комплексов ДХ-НК и Nt-НК с хорошей точностью совпадают со значением ΔH , полученным из микрокалориметрических измерений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаян Ю.С., Манзини Дж.* Взаимодействие противоопухолевого соединения митоксантрона с двуспиральными нуклеиновыми кислотами. Молекул. биология, 24, 4, с. 1084-1094, 1990.
2. *Babayyan Yu.S., Hakobyan S.N., Ghazaryan R.S., Shahinyan M.A.* Thermostability of DNA complexes with mitoxantrone at small fillings. Biophys. Reviews and Letters, 12, 3, p. 141-149, 2017.

3. Babayan Yu.S., Hakobyan S.N., Ghazaryan R.S., Shahinyan M.A. Interaction of antitumor agent mitoxantrone with double helical synthetic polyribonucleotides polyGpolyC and polyIpolyC. *Biophys. Rev. and Lett.*, 12, 4, p. 165-176, 2017.
4. Babayan Yu., Manzini G., Xodo L.E., Quadrifoglio F. Base specificity in the interaction of ethidium with synthetic polyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 15, 14, p. 5803-5812, 1987.
5. Bhattacharya J., Basu A., Kumar G.S. Intercalative interaction of the anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: A calorimetric characterization of the energetics. *J. Chem. Thermodyn.*, 75, p. 45-51, 2014.
6. Blake R.D., Delcourt S.G. Thermal stability of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 26, p. 3323-3332, 1998.
7. Bruylants G., Wonters J., Michaux C. Differential scanning calorimetry in life science: Thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current Med. Chem.*, 12, p. 2011-2022, 2005.
8. Caravallo C., Sato R.X., Cardoso S. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Med. Chem.*, 16, 25, p. 3267-3285, 2009.
9. Chaires J.B. Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annual Review of Biophysics*, 37, p. 135-151, 2008.
10. Geierstranger B.H., Wemmer D.E. Complexes of the minor groove of DNA. *Annu. Rev. Biomol. Struct.*, 24, p. 463-493, 1995.
11. Khalaf A.I. Minor groove binders: some recent research in drug development. *Current Trends in Med. Chemistry*, 6, p. 53-63, 2009.
12. Lane A.N., Jenkins T.C. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 33, 3, p. 255-306, 2000.
13. Lewis E.A., Munde M., Wang S., Rettig M., Le V., Machha V., Wilson W.D. Complexity in the binding of minor groove agents: Netropsin has two thermodynamically different DNA binding modes at a single site. *Nucl. Acids res.*, 39, 22, p. 9649-9658, 2011.
14. Marky L.A., Snyder J.G., Remeta D.P., Breslauer K.J. Thermodynamics of drug-DNA interactions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1, p. 487-507, 1983.
15. Michal M., Dalbor H., Vojtech A., Jaroslav B., Tomas E., Stiborova M., Kizek K. Doxorubicin and genomic DNA, new insights in drug-nucleic acids interactions. I. *J. Molecular Medicine*, 24, p. 549-569, 2009.
16. Perez-Aznai C., Busto N., Leal J.M., Garcia B. New insights into the mechanism of DNA-doxorubicin interaction. *J. Phys. Chem.*, 118, 5, p. 1288-1295, 2014.
17. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Hakobyan S.N. Thermodynamic parameters analysis of ethidium bromide and mitoxantrone binding with DNA by adsorption isotherms. *Rus. J. Phys. Chem.*, 91, 6, p. 1143-1145, 2017.

Поступила 28.08.2018