

NMR STUDIE INTERAKCE DERIVÁTŮ DISTAMYCINU S DNA

JARMILA FOLTÝNOVÁ*, MARCELA
TKADLECOVÁ, MARTIN VALÍK, LUKÁŠ
PALIVEC a VLADIMÍR KRÁL

Ústav analytické chemie, VŠCHT, Technická 3, 166 28
Praha 6

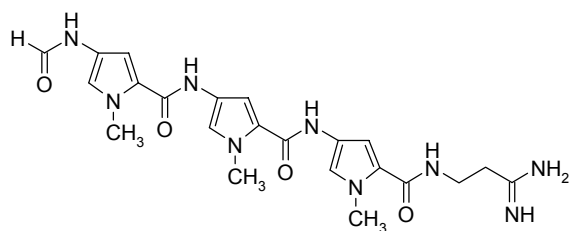
Jarmila.Foltynova@vscht.cz

Došlo 7.4.05, přijato 18.11.05.

Klíčová slova: Trögerova báze, distamycin, DNA, NMR

Úvod

Nukleové kyseliny reverzibilně interagují s rozsáhlou skupinou malých organických molekul, což hraje důležitou roli při výzkumu nových léčiv vyvíjených pro léčbu rakovinných a virových onemocnění. Mezi tyto látky patří i přírodní oligopeptid distamycin A (obr. 1). Ten se neko-



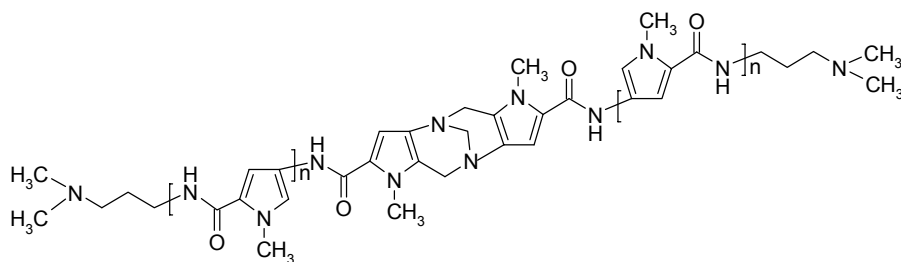
Obr. 1. Strukturní vzorec distamycinu A

valentně váže na DNA do malého žlábků, preferenčně v oblastech sekvenci bází adeninu a thyminu¹. Cílem řady výzkumných projektů je syntetizovat dimerní deriváty této přírodní formy a sledovat jejich interakci s DNA, případně docílit lepších vazebných schopností mimo sekvence adenin-thymin^{2–4}.

V předkládané práci je tato interakce sledována spektroskopii NMR u řady derivátů dystamycinu, které byly již dříve syntetizovány na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha⁵. Jednotlivé deriváty se od sebe liší počtem *N*-methylpyrolových jednotek a oproti přírodní formě obsahují navíc v centru molekuly Trögerovu bázi (obr. 2).

Ve spektroskopii NMR jsou intra- či intermolekulární dynamické procesy označovány pojmem chemická výměna. Její vliv na vzhled spektra souvisí s rychlostí výměny a s rozdílem rezonančních frekvencí signálů sledovaného jádra v jednotlivých stavech, mezi nimiž výměna probíhá. Pokud je tato výměna pomalá, obsahuje spektrum dva signály, odpovídající jednotlivým stavům. Je-li výměna rychlá, dojde ve spektru ke splnutí signálů a pozorujeme pouze jeden pík, ovšem na jiném místě, než byly původní – u výměny mezi dvěma stejně populovanými signály uprostřed. Proto jsou ve spektru při studiu interakcí sledovány dva základní parametry: rozšiřování píků a chemický posun signálů. To odpovídá chemické výměně mezi volnou formou pozorované látky a formou vázanou na jinou molekulu.

Dalším parametrem pro studium interakce je změna relaxace, tzn. návratu systému po vybuzení radiofrekvenčním pulsem zpět do rovnovážného stavu. Rozlišujeme dva různé relaxační procesy: spin-mřížkovou relaxaci (podélná) a spin-spinovou relaxaci (příčná). V práci jsme se zaměřili na sledování změny spin-mřížkové relaxace, při níž relaxující jádro předá energii translačním a rotačním pohybům jader a elektronů, které tvoří tzv. mřížku, čímž je označováno okolí daného jádra. Rychlost relaxace je dána rychlostní konstantou $1/T_1$, kde T_1 je spin-mřížkový relaxační čas. Obecně platí pravidlo, že čím rychleji se molekula pohybuje, tím větší je hodnota T_1 , tj. navázáním malé molekuly na větší by se hodnota T_1 měla zmenšovat.



Obr. 2. Dimerní deriváty distamycinu; a) $n=0$ (derivát 0); b) $n=1$ (derivát 1); c) $n=2$ (derivát 2); d) $n=3$ (derivát 3)

* Jarmila Foltýnová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

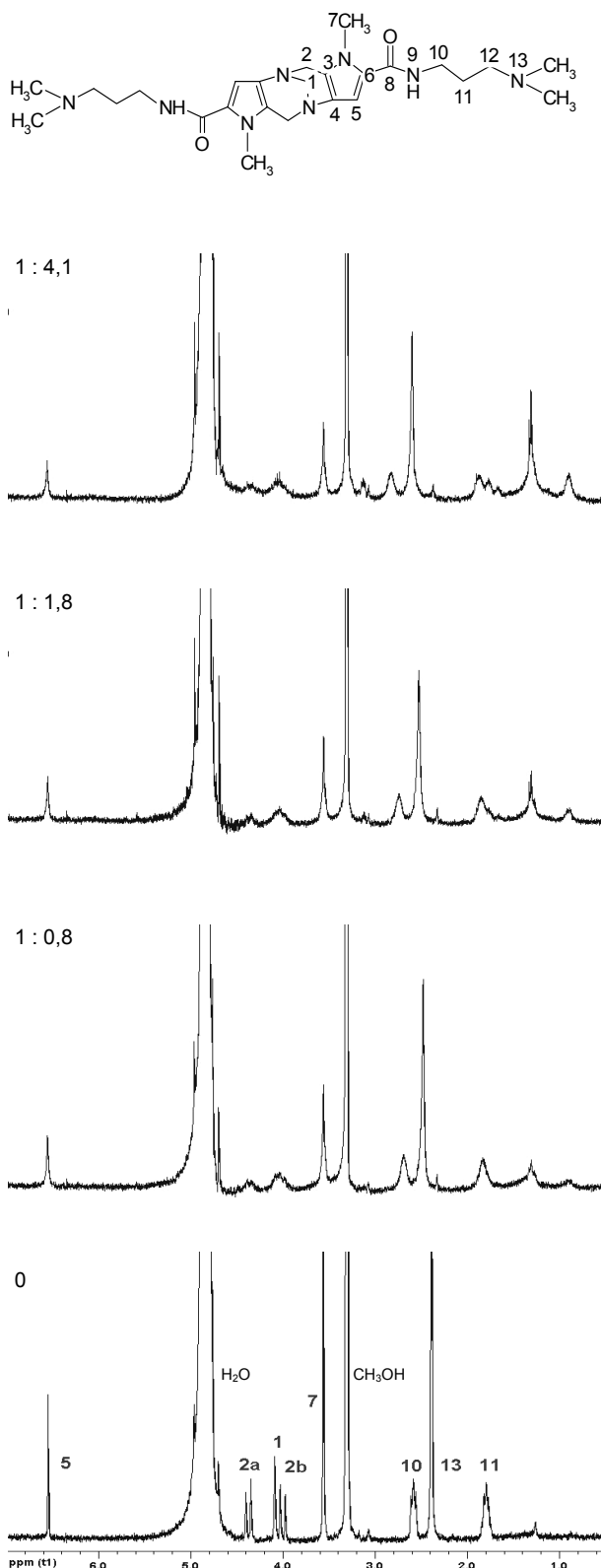
Experimentální část

Všechna spektra byla měřena na spektrometru firmy Varian, model Mercury Plus (300 MHz). Při přípravě roztoků DNA byla použita míchačka VSM-3 (Shelton Scientific) a ultrazvuková lázeň (Merck). Pro přiřazení signálů distamycinových derivátů v ^1H a ^{13}C spektrech byly použity roztoky v dimethylsulfoxidu – d_6 (99,9 %-D, Aldrich), kde jsou všechny deriváty dobře rozpustné. Byla měřena spektra ^1H NMR (též s potlačením signálu rozpouštědla), dále ^{13}C NMR, apt a dvoudimenzionální spektra gCOSY, gHSQC a gHMBC. Relaxační časy T_1 byly měřeny metodou inverze populací. Pro měření vodíkových spekter bylo používáno 64 skenů a snímáno 36 000 bodů. Měření byla prováděna za konstantní teploty 298 K. Studované distamycinové deriváty byly syntetizované na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha⁵, relativní molekulové hmotnosti (potvrzené hmotnostní spektrometrií; čísla derivátů odpovídají počtu *N*-methylpyrolových jednotek v molekule, viz obr. 2): derivát 0 – 484, derivát 1 – 787, derivát 2 – 972, derivát 3 – 1216. Použitá DNA byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich, sonifikována v ultrazvukové lázni, lyofilizována dvakrát v D_2O k dosažení výměny deuterium-vodík. Interakci s DNA bylo nutno sledovat ve vodných roztocích. Pro zlepšení rozpustnosti vyšších distamycinových derivátů bylo použito směsné rozpouštědlo voda (99,9 %-D, Aldrich) – methanol (99,8 %-D, Aldrich) v objemovém poměru 2:1. Výpočet přidaného množství DNA vycházel z látkových množství jednotlivých derivátů a průměrné relativní molekulové hmotnosti pro jeden pár bází DNA, která činí 666.

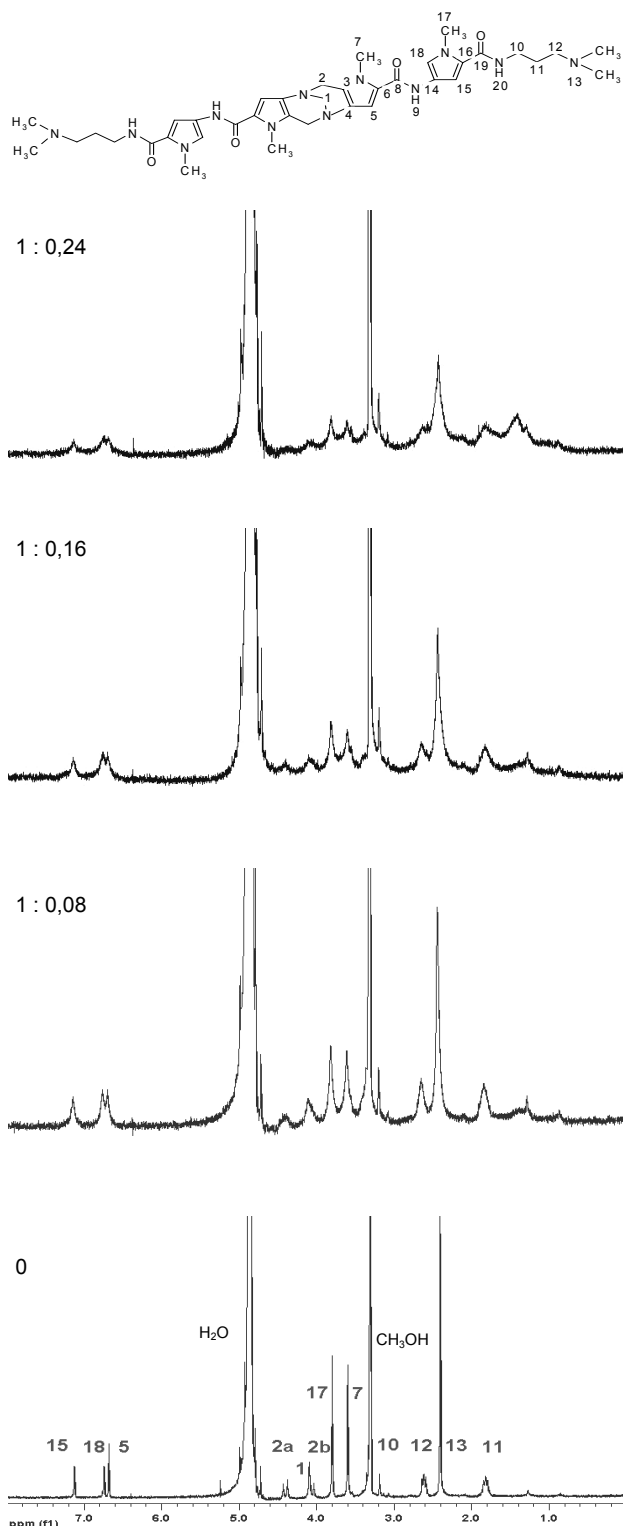
Výsledky a diskuse

Ve vodíkových spektrech derivátu 0 během přidavku DNA (obr. 3) je patrné, že dochází k rozšiřování signálů, což odpovídá chemické výměně mezi různými formami, v tomto případě formou volnou a formou či formami vázanými na DNA – z toho lze usuzovat na vzájemnou interakci. Nejvíce jsou ovlivněny signál 2 odpovídající skupině CH_2 Trögerovy báze, a dále pak signál 5, patřící skupině CH v pyrolovém kruhu. Titrace byla provedena též v deuterované vodě, přičemž výsledky byly srovnatelné jako při použití směsného rozpouštědla voda-methanol. Při přidávání DNA k derivátu 1 (obr. 4) docházelo k velmi podobným změnám jako u menšího derivátu, ovšem spektra se výrazně změnila již při nepatrném přidavku. Z toho plyne, že interakce je ovlivněna počtem *N*-methylpyrolových jednotek a že vazba na DNA probíhá podobným způsobem jako u derivátu 0. Rozšiřování signálů u obou předchozích derivátů hned po přidavku malého množství DNA má za následek zhoršené měření relaxačních časů T_1 . Přesto jsme zjistili, že dochází k jejich snižování.

Změny ve vodíkových spektrech derivátu 2 při přidávání DNA nebyly tak patrné jako pro předchozí dva



Obr. 3. Přidavky DNA k derivátu 0 (vlevo uveden poměr $n(\text{derivátu}) : n(\text{DNA})$)



Obr. 4. Přidavky DNA k derivátu 1; (vlevo uveden poměr $n(\text{derivátu}) : n(\text{DNA})$)

deriváty. Pouze v oblasti skupin CH začleněných do pyrrolových kruhů je zřetelný posun jednoho ze signálů. Dá se tedy předpokládat interakce s DNA i pro tento derivát.

Interakce derivátu 3, který vykazuje velmi špatnou rozpustnost i ve směsném rozpouštědle voda-methanol, byla prozatím zkoumána pouze pomocí cirkulárního dichroismu. Ukázalo se, že se derivát 3 specificky váže na DNA. Pro deriváty 0 a 1 spektra cirkulárního dichroismu nevykazují žádné pozorovatelné změny signálů, což naznačuje, že probíhající vazebná interakce je nespecifická.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MŠMT č. 6046137307.

LITERATURA

1. Geierstanger B. H., Dwyer T. J., Bathini Y., Lown J. W., Wemmer D. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4474 (1993).
2. Weihong D., Baohua W., Zhifen L., Junhua X., Gu Y., Weiqiang H.: *Thermochim. Acta* 395, 257 (2003).
3. Conte M. R., Fattorusso E., Palorna L. G., Mayol L.: *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2, 1299 (1992).
4. Dwyer T. J., Geierstanger B. H., Bathini Y., Lown J. W., Wemmer D. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5911 (1992).
5. Valík M., Dolenský B., Petříčková H., Vašek P., Král V.: *J. Tetrahedron Lett.* 16, 2083 (2003).
6. Friebolin H.: *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. Wiley, Weinheim 1998.
7. Buděšínský M., Pelnař J.: *Organická chemie*, sv. 25. ÚOCHB ČSAV, Praha 2000.

J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Valík, L. Palivec, and V. Král (Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Interaction of Novel Dimeric Distamycin Derivatives with DNA: NMR Study**

A series of novel dimeric distamycin derivatives with increasing number of 1-methylpyrrole units, was synthesized. In comparison with natural distamycin, the dimeric derivatives contain a Tröger base as a bridging unit in the centres of their molecules. The main goal of this work was to study the influence of interaction with calf thymus DNA on the distamycin derivative molecule by ^1H NMR spectrometry and to determine the binding site. It was observed that addition of DNA caused broadening of hydrogen signals and also changes in corresponding relaxation times. Both facts are in accordance with the assumed interaction. The results are discussed for different derivatives in dependence on the possible binding site and compared with those from circular dichroism.