



УДК 577.32.23

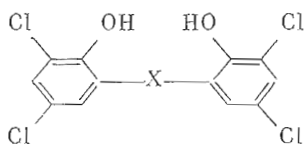
ВЗАИМОЗАВИСИМОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ДВУХ ЛИГАНДОВ БЕЛКАМИ. СВЯЗЫВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИГЕЛЬМИНТИКОВ И ЛАУРИНОВОЙ КИСЛОТЫ БЫЧИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Денисова Л. И.*, Бессмертная Л. Я., Руми Л. Д., Антонов В. К.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва;
* Всесоюзный институт гельминтологии им. К. И. Скрябина ВАСХНИЛ СССР, Москва

Исследовано взаимодействие 2,2'-диокси-3,3',5,5'-тетрахлордифенилсульфида (I) и соответствующих сульфоксида (II) и сульфона (III) с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Показано, что соединения (I)–(III) тушат собственную флуоресценцию БСА. Соединения (I) и (III) взаимодействуют с БСА по одному типу центров с константами диссоциации соответственно $1,1 \cdot 10^{-5}$ и $3,3 \cdot 10^{-6}$ М. Соединение (II) реагирует с двумя типами центров БСА с константами диссоциации K_1 $3,3 \cdot 10^{-6}$ и K_2 $5 \cdot 10^{-7}$ М. Стехиометрия связывания лигандов с БСА определена методом равновесного диализа. В рамках метода Скотчарда сформулированы критерии взаимозависимости и взаимонезависимости связывания двух лигандов. Показано, что лауриновая кислота и соединения (I)–(III) связываются с БСА взаимонезависимо.

Ароматические сульфиды, сульфоксиды и сульфоны, производные фенолов, являются биологически активными соединениями с разнообразным спектром действия. Некоторые из них широко применяются в медицине и ветеринарии, в частности как антигельминтные препараты [1]. К таким соединениям относятся 2,2'-диокси-3,3',5,5'-тетрахлордифенилсульфид (битионол) (I) и его производные — соответствующий сульфоксид (II) и сульфон (III):



(I): X = S, (II): X = SO, (III): X = SO₂

Эти близкие по строению вещества различаются по физико-химическим свойствам, а также по терапевтическим и фармакологическим показателям [2]. Имеются сведения [3, 4], что токсичность некоторых лекарственных веществ зависит от их способности связываться с белками сыворотки крови. В таких случаях концентрация комплекса белок — лекарственное вещество может быть изменена введением соединений, конкурирующих за связывание с белком. Все это побудило нас изучить связывание битионола и его аналогов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и выяснить, способны ли жирные кислоты конкурировать с ними за связывание.

Мы обнаружили, что собственная флуоресценция БСА ($\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм, $\lambda_{\text{эмис}}$ 345 нм) эффективно тушится исследуемыми соединениями (I)–(III). На рис. 1 в качестве примера приведены спектры флуоресценции БСА в присутствии различных концентраций битионола. Из-за низкой растворимости изучаемых веществ измерения проводили в фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 8% (по объему) диметилформамида.

Значения наблюдаемых для каждой концентрации лиганда интенсивностей флуоресценции ($I_{\text{набл}}$) корректировали на поглощение света возбуждения и эмиссии белком и лигандами по методу [5]. Величину функции насыщения вычисляли по формуле $r = (I_0 - I_{\text{набл}}) / (I_0 - I_m)$, где I_0 — интен-

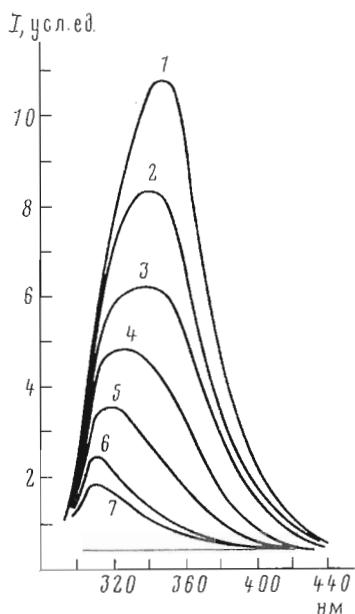


Рис. 1

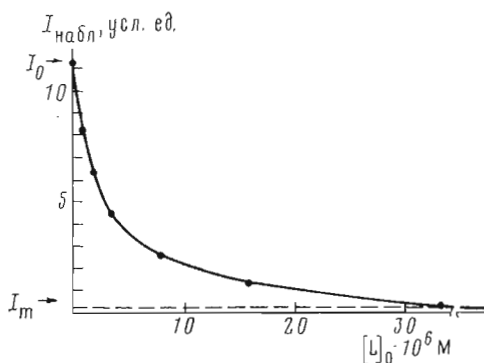


Рис. 2

Рис. 1. Спектры флуоресценции свободного БСА (1) и БСА в присутствии битриптола (1) в концентрации (мкМ): 1 (2), 2 (3), 4 (4), 8 (5), 16 (6) и 32 (7)

Рис. 2. Зависимость наблюдаемой интенсивности флуоресценции БСА от общей концентрации битриптола (1). Наблюдаемая флуоресценция скорректирована на поглощение света возбуждения и эмиссии по работе [5]

сивность флуоресценции свободного БСА, а I_m — предельное значение интенсивности флуоресценции при насыщении белка лигандом. Эту последнюю величину определяли экстраполяцией графика зависимости $I_{\text{набл}}$ от концентрации лиганда $[L]_0$ к бесконечной его концентрации (рис. 2). Данные эксперимента обрабатывали по методу Скетчарда [6]:

$$r = n - \frac{r}{[L]_{\text{св}}} K,$$

строая зависимость $r/[L]_{\text{св}}$ от r , где $[L]_{\text{св}}$ — концентрация свободного лиганда, K — константа диссоциации. Чтобы определить полное число связываемых белком молекул лиганда (n), мы использовали метод равновесного диализа при насыщающих (по данным флуоресценции, рис. 2) концентрациях лигандов. Определение концентрации лигандов проводили спектрофотометрически в максимуме их поглощения, вводя поправку на небольшое при этих длинах волны поглощение белка. К сожалению, получить этим методом полные графики Скетчарда невозможно из-за малых различий в поглощении внутри и вне диализного мешка при низких концентрациях лиганда.

Поскольку при насыщающих концентрациях лиганда остаточная флуоресценция БСА близка к нулю, можно обоснованно предположить, что стехиометрия, полученная методом равновесного диализа, и истинное число молекул лиганда, вызывающее полное тушение флуоресценции белка, совпадают.

На рис. 3–5 приведены полученные графики Скетчарда. Пересечение прямых с осью ординат позволяет вычислить значения констант диссоциации ($K = n[L]_{\text{св}}/r$). В таблице даны значения констант диссоциации (K) и число связывающих лиганд центров (n). Для соединений (I) и (III) графики Скетчарда линейны, что указывает на один тип идентичных и независимых центров связывания этих соединений па БСА. Сульфон (III) связывается с БСА более прочно, чем сульфид (I), но число молекул

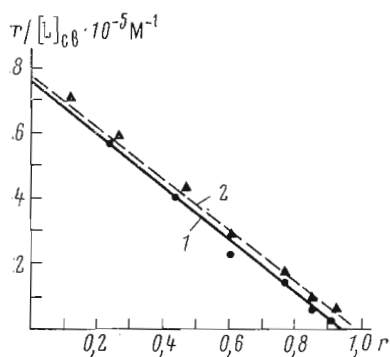


Рис. 3

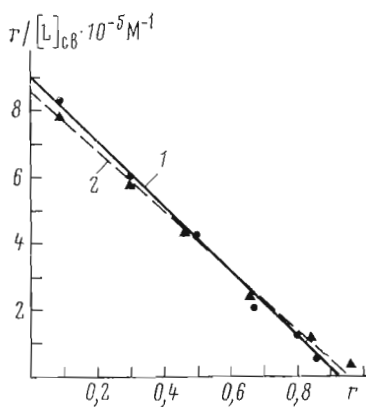


Рис 5

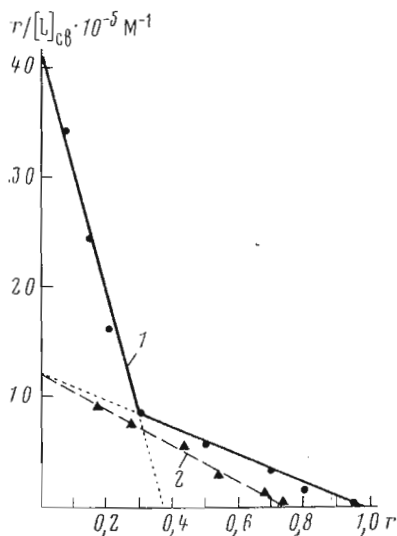


Рис. 4

Рис. 3. График Скетчарда для связывания битумола (I) с БСА в отсутствие (1) и в присутствии (2) лауриновой кислоты ($0,33 \cdot 10^{-4}$ M)

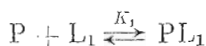
Рис. 4. График Скетчарда для связывания сульфоксида (II) с БСА в отсутствие (1) и в присутствии (2) лауриновой кислоты ($0,33 \cdot 10^{-4}$ M)

Рис. 5. График Скетчарда для связывания сульфона (III) с БСА в отсутствие (1) и в присутствии (2) лауриновой кислоты ($0,33 \cdot 10^{-4}$ M)

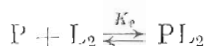
последнего, образующих комплекс с белком, значительно больше. Более сложная картина наблюдается для вещества (II). Оно дает нелинейный график Скетчарда, который можно интерпретировать [7] как наличие двух типов независимых активных центров связывания сульфоксида (II) на БСА. Расчет констант связывания по методу [8] показывает, что центры с низким сродством связывают сульфоксид (II) с константой, практически совпадающей с найденной для сульфона (III). Центры с высоким сродством имеют константу диссоциации, примерно в 7 раз меньшую.

В качестве второго лиганда, потенциально способного вытеснить вещества (I) — (III) из комплекса с БСА, мы использовали лауриновую кислоту. Это соединение эффективно связывается с БСА по нескольким центрам с константами порядка $6 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-6}$ M [9], однако очень слабо тушит собственную флуоресценцию белка. Введение в систему БСА — лауриновая кислота веществ (I) — (III) приводит к тушению флуоресценции, а добавление к смеси БСА + (II) лауриновой кислоты увеличивает интенсивность флуоресценции.

Связывание двух лигандов белком (P) может быть взаимозависимым, когда один лиганд не связывается, пока связан второй:



и

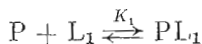


Параметры комплексообразования соединений (I)–(III) с бычьим сывороточным альбумином в отсутствие (–) и в присутствии (+) $0,33 \cdot 10^{-4}$ М лауриновой кислоты
 0,1 М фосфатный буфер, рН 7, 25° С, 8% (об.) диметилформамида,
 $[P]_0 = 4,86 \cdot 10^{-6}$ М

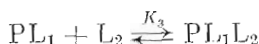
L_1	$[L_1]_0$, мкМ	Лауриновая кислота	$K \cdot 10^6$, М	n *
(I)	1–32 0,56–33,3	– +	$11,8 \pm 1,5$ $11,5 \pm 1,4$	$9 \pm 0,5$ –
(II)	0,05–32 0,7–64	– +	$K_1 = 3,3 \pm 0,5$ $K_2 = 0,49 \pm 0,1$ $K_3 = 130 \pm 10$	$6 \pm 0,3$ (4+2) – $3 \pm 0,3$
(III)	0,5–64 1–64	– +	$3,35 \pm 0,5$ $3,5 \pm 0,4$	– –

* Получено методом равновесного диализа.

и взаимонезависимым, когда оба лиганда могут образовать тройной комплекс:



и



Различить эти два типа связывания можно по характеру графиков Скетчарда в отсутствие и в присутствии второго лиганда. Действительно, для взаимозависимого связывания график Скетчарда в присутствии второго лиганда (при $n=1$) описывается выражением

$$r = 1 - \frac{r}{[L_1]_{св}} \left[\frac{K_1(K_2 + [L_2]_{св})}{K_2} \right]. \quad (1)$$

Отсюда следует, что этот график будет пересекать ось абсцисс в точке $r=1$, а ось ординат — в точке $r/[L_1]_{св} = K_2/K_1(K_2 + [L_2]_{св})$.

Для взаимонезависимого связывания уравнение Скетчарда в присутствии второго лиганда будет:

$$r = \frac{K_3}{K_3 + [L_2]_{св}} - \frac{r}{[L_1]_{св}} \left(\frac{K_1 K_3}{K_3 + [L_2]_{св}} \right). \quad (2)$$

В этом случае прямая будет пересекать ось абсцисс в точке $r = K_3/(K_3 + [L_2]_{св})$, а ось ординат — в точке $r/[L_1]_{св} = 1/K_1$. Таким образом, при взаимозависимом связывании прямые в присутствии и в отсутствие второго лиганда будут пересекаться на оси абсцисс, а в случае взаимонезависимого связывания — на оси ординат. Однако, если K_2 (или K_3) $\gg [L_2]_{св}$, обе прямые будут совпадать.

Именно этот последний случай реализуется при связывании лауриновой кислоты и соединений (I) и (III) с БСА (рис. 3 и 5). Прямые на графиках Скетчарда в отсутствие и в присутствии лауриновой кислоты ($0,33 \cdot 10^{-4}$ М) в пределах ошибки опыта совпадают. Формально это не дает возможности выбрать между механизмами взаимозависимого и взаимонезависимого связывания для этих веществ. Однако приведенное выше значение константы связывания лауриновой кислоты [9] показывает, что использованная в этих опытах концентрация много больше, чем K_2 , т. е. очевидно, что $K_2 \ll [L_2]_{св}$. Для механизма взаимозависимого связывания (ур-ние 1) выбранные условия не могут привести к совпадению графиков. В случае же взаимонезависимого связывания совпадение прямых может означать, что константа диссоциации тройного комплекса (K_3) выше, чем концентрация свободной лауриновой кислоты. Таким образом, лауриновая кислота и соединения (I) и (II) связываются с БСА взаимонезависимо.

Из графика на рис. 4 по связыванию сульфоксида (II) и лауриновой

кислоты видно, что последняя также связывается взаимонезависимо по отношению к центрам с низким сродством к сульфоксиду. Из этого графика (предполагая, что $[L_2]_{ca} \approx [L_2]_0$) можно определить максимальную величину K_3 по формуле (см. ур-ние (2)):

$$K_3 = \frac{r_0 [L_2]_0}{1 - r_0},$$

где r_0 — отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс. Полученное значение ($1,3 \cdot 10^{-4}$ М) действительно несколько выше, чем использованная концентрация лауриновой кислоты. Следует подчеркнуть, что это значение нельзя сопоставлять со значениями, приведенными в литературе, поскольку последние характеризуют диссоциацию двойного комплекса (БСА — лауриновая кислота), а не тройного (БСА — лауриновая кислота — сульфоксид (II)).

Анализируя полученные данные, отметим, что стехиометрия связывания сульфида (I) и его производных (II) и (III) с БСА хорошо коррелирует с гидрофобностью этих соединений (R_i 0,89; 0,41 и 0,35 соответственно [1]). Вместе с тем, чем выше гидрофобность, тем слабее связывание, т. е. выше константа диссоциации комплекса. При связывании битинола максимум эмиссии в спектре флуоресценции БСА сдвигается в коротковолновую область (рис. 1), что, вероятно, обусловлено снижением полярности окружения остатков триптофана в белке. Сульфоксид (II) способен связываться в иных, чем сульфид и сульфен, центрах белка, по-видимому, из-за наличия у этого соединения семиполярной S→O-связи. Все исследованные вещества не конкурируют с лауриновой кислотой за центры связывания па БСА и способны образовывать тройные комплексы. Комплекс БСА—(II)—лауриновая кислота легко диссоциирует ($K_3 \approx 1,3 \cdot 10^{-4}$ М), т. е., несмотря на отсутствие конкуренции, сродство БСА к сульфоксиду в присутствии лауриновой кислоты заметно снижается. Токсичность исследуемых веществ в опытах на животных [1] тем выше, чем меньше вещества связывается с БСА. Отсюда вытекает, что в присутствии лауриновой кислоты большая доля антигельминтика будет находиться в крови в не связанном с БСА виде и токсичность вещества, по-видимому, будет увеличиваться.

Экспериментальная часть

Соединения (I)—(III) получены как описано в работах [10—12]. Использовалась лауриновая кислота (Sigma, ФРГ) и бычий сывороточный альбумин (Calbiochem, США). Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм и по окрашиванию кумасси [13]. Спектрофотометрирование проводили на приборе Gilford 2400-2.

Спектры флуоресценции снимали на приборе Hitachi MPF-3 при $\lambda_{возб}$ 280 нм (щель возбуждения 5 нм, щель эмиссии 6 нм). В кювету спектрофлуориметра помещали по 1 мл запасных растворов БСА и исследуемых соединений в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7), содержащем 8% (по объему) диметилформамида и 1 мл раствора лауриновой кислоты в том же буфере или 1 мл буферного раствора. Спектры флуоресценции корректировали на флуоресценцию растворов соединений (I)—(III) в отсутствие БСА. Обсчет данных проводили по методу наименьших квадратов.

Равновесный диализ осуществляли в диализных мешочках (Visking, ГДР), помещая в мешочек по 2 мл раствора БСА в указанном выше буфере и в стакан по 70 мл раствора вещества (I)—(III) в том же буфере. Диализ продолжался 24 ч (25° С), после чего пробы из мешочка и внешнего раствора спектрофотометрировали. Данные корректировали на поглощение БСА при использованной длине волны (для соединений (I)—(III) 306, 332 и 317 нм соответственно). Величину n вычисляли по формуле

$$n = \frac{[PL_n] / [P]_0}{\left(\frac{[L_{нап}]}{[L_{нап}]_0} - 1 \right) \frac{[L]_0}{[P]_0}},$$

где $L_{\text{вн}}$ и $L_{\text{нар}}$ — концентрация лиганда в диализном мешочке и в наружном растворе, $[L]_0$ — исходная концентрация лиганда и $[P]_0$ — концентрация БСА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисова Л. И. Тр. Всесоюз. ин-та гельминтологии, 1975, т. 22, с. 57–69.
2. Денисова Л. И., Орлова В. А. Хим.-фармацевт. журн., 1973, № 3, с. 33–36.
3. Биохимическая фармакология/Ред. Сергеев П. В. М.: Высш. шк., 1982, с. 87.
4. Szekerke G., Horvath M. Arzneimittel-Forsch., 1976, В. 26, № 8, S. 478–482.
5. Бурштейн Э. А. Биофизика, 1968, т. 13, № 3, с. 433–436.
6. Scatchard G. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, v. 51, № 4, p. 660–672.
7. Klotz I. M., Hunston D. L. Biochemistry, 1971, v. 10, № 16, p. 3065–3069.
8. Вондарева А. П., Колосов И. В., Ландау М. А. Координац. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 264–274.
9. Reynolds J., Herbert S., Steinardt J. Biochemistry, 1968, v. 7, № 4, p. 1357–1361.
10. Денисова Л. И., Батякина В. А., Демидов И. В. Бюл. Всесоюз. ин-та гельминтологии, 1965, вып. 1, с. 70–72.
11. Денисова Л. И., Батякина В. А. Хим.-фармацевт. журн., 1970, № 8, с. 9–11.
12. Орлова В. А., Денисова Л. И. Тр. Всесоюз. ин-та гельминтологии, 1971, т. 18, с. 201–205.
13. Bradford M. M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1–2, p. 248–254.

Поступила в редакцию
3.II.1984
После доработки
18.VII.1984

MUTUAL DEPENDENCE OF TWO LIGANDS BINDING BY PROTEINS. BINDING OF PHENOLIC ANTIHELMINTICS AND LAURINIC ACID BY BOVINE SERUM ALBUMINE

DENISOVA L. I.*, BESSMERTNAYA L. Ya., RUMSH L. D., ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; *K. I. Skryabin All-Union Institute of Helminatology, Academy of Agricultural Sciences of the USSR, Moscow*

The interactions of 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrachlorodiphenylsulfide (I) and corresponding sulfoxide (II) and sulfone (III) with bovine serum albumine (BSA) have been studied. It was shown that compounds (I)–(III) quench the intrinsic fluorescence of BSA. Compounds (I) and (III) bind to one type of the BSA active sites with K_d ca. $1,1 \cdot 10^{-5}$ and $3,3 \cdot 10^{-6}$ M, respectively. Compound (II) reacts with two types of the active sites with the K_1 $3,3 \cdot 10^{-6}$ and K_2 $5 \cdot 10^{-7}$ M. Stoichiometry of ligand binding was determined by the equilibrium dialysis method. The criteria for mutual dependence of binding two ligands by protein have been formulated in the framework of the Scatchard's method. It was shown that binding of laurinic acid and compounds (I)–(III) by BSA was independent.