

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук

На правах рукописи

Дурандин Никита Александрович

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛОГОВ
ОЛИВОМИЦИНА А И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ДНК**

02.00.04 – физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель: Доктор химических наук,
профессор
Кузьмин Владимир Александрович

Москва-2014

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Типы комплексообразования различных лигандов с ДНК.....	11
1.1.1 Особенности структуры двойной спирали, определяющие основные закономерности взаимодействия лигандов с ДНК.....	11
1.1.1.1 Соединения, интеркалирующие между парами оснований ДНК... ..	13
1.1.1.2 Соединения с локализацией при связывании в узкой бороздке ДНК.....	15
1.1.1.3 Соединения с локализацией при связывании в широкой бороздке ДНК.....	16
1.1.1.4 Соединения, ковалентно связывающиеся с ДНК.....	17
1.1.2 Жидкокристаллические дисперсии на основе двухцепочечной ДНК в водно-полимерных растворах и характеристика их взаимодействия с лигандами.....	17
1.1.2.1. Типы жидкокристаллических фаз.....	18
1.1.2.2. Круговой дихроизм дисперсий нуклеиновых кислот и их комплексов с лигандами.....	21
1.2 Антибиотики ряда ауреоловой кислоты. Структура и свойства.....	22
1.2.1 Типы комплексов антибиотиков ряда ауреоловой кислоты с ДНК... ..	27
1.2.2 Спектроскопия кругового дихроизма соединений ряда ауреоловой кислоты и их комплексов с ДНК.....	32
1.2.3 Зависимость между структурой и антибиотической активностью соединений ряда ауреоловой кислоты.....	35
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Материалы и реактивы.....	37
2.2 Методики.....	39
2.2.1 Спектрофотометрический метод.....	39
2.2.2 Спектрофлуориметрический метод.....	39
2.2.3 Спектроскопия кругового дихроизма.....	40
2.2.4 Метод остановленной струи.....	41
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	42
3.1 Физико-химические свойства аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы и их комплексов с ДНК.....	42

3.1.1 Исследование комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК методом спектрофотометрии.....	42
3.1.2 Исследование взаимодействия аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК методом кругового дихроизма.....	44
3.1.3 Исследование комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК методом спектрофлуориметрии.....	47
3.1.3.1 Определение констант комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК.....	47
3.1.3.2. Определение квантовых выходов флуоресценции аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы и их комплексов с ДНК.....	55
3.2 Физико-химические свойства производных оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона и их комплексов с ДНК.....	.60
3.2.1 Спектрофлуориметрическое исследование комплексообразования производных оливомицина А с карбоксильным и –N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с ДНК.....	60
3.2.1.1 Определение констант комплексообразования производных оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с ДНК.....	60
3.2.1.2 Определение квантовых выходов флуоресценции комплексов аналогов оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с ДНК.....	63
3.3 Спектрально-кинетические характеристики комплексов оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2.	65
3.3.1 Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом спектрофотометрии.....	65
3.3.2 Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом кругового дихроизма.....	67
3.3.3 Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом спектрофлуориметрии.....	69
3.3.3.1 Определение констант комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и	

Sp1/NFAT-m2.	70
3.3.4 Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом остановленной струи с флуоресцентной детекцией.	74
3.4 Физико-химические характеристики комплексообразования оливомицина А с жидкокристаллической дисперсией на основе ДНК.....	82
3.4.1 Исследование изменения структуры холестерической жидкокристаллической дисперсии на основе ДНК под действием оливомицина А методом кругового дихроизма.	83
4. ВЫВОДЫ.	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	92

Список используемых сокращений:

ЛСТА-254 – оливомицин А

ЛСТА-1721 – оливомицин В

ЛСТА-255 – оливомицин С

ЛСТА-1839 – Де-Е4-изобутирилоливомицин С

ЛСТА-1840 – Де-Е4-изобутирилоливомицин А

ЛСТА-1599 – N,N-диметиламиноэтилаид 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксиоливомицина А

ЛСТА-1498 – 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксиоливомицин А

Олигонуклеотид Sp1/NFAT – олигонуклеотид, несущий сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, со структурой d(TGGCGGGAAAAAG)₂

Олигонуклеотид Sp1/NFAT-m1 – аналог олигонуклеотида, несущего сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, со структурой d(TGTAGGGAAAAAG)₂

Олигонуклеотид Sp1/NFAT-m2 - аналог олигонуклеотида, несущего сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, со структурой d(TGTAGGTAAAAAG)₂

УФ – ультрафиолетовый

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

КД – круговой дихроизм

НК – нуклеиновая кислота

дцДНК - двухцепочечная ДНК

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

хжкд-ДНК - холестерическая жидкокристаллическая дисперсия на основе дцДНК

Введение

Оливомицины (производные оливомицина А) относятся к природным антибиотикам группы ауреоловой кислоты, широкое применение которых ограничено их высокой общерезорбтивной токсичностью. Изучение взаимодействия антибиотиков с мишенью на молекулярном уровне важно для направленного синтеза высокоэффективных и малотоксичных синтетических противоопухолевых препаратов с выраженной биологической (противоопухолевой, противомикробной) активностью и низкой неспецифической токсичностью.

Один из наиболее плодотворных подходов при таргетной терапии основан на поиске ингибиторов важнейших мишеней опухолевых клеток среди природных соединений и, прежде всего, антибиотиков. В большинстве случаев создание принципиально нового лекарственного препарата состоит из открытия (выделения) новой высоко активной (часто токсичной) структуры из природного источника и ее модификации с целью придания ей более благоприятных фармакологических свойств.

Важнейший современный подход к созданию новых противоопухолевых лекарств основан на идентификации молекулярных мишеней, специфических для раковой клетки, и направленном поиске ингибиторов этих мишеней, что должно обеспечить более эффективную селективную (менее токсичную) терапию опухолей. Ведется активный поиск индукторов апоптоза опухолевых клеток, ингибиторов ангиогенеза, важнейших ферментов нуклеинового обмена – топоизомераз I и II, теломеразы, протеинкиназ различного типа, регулирующих клеточный цикл, а также направленный поиск препаратов, преодолевающих лекарственную резистентность опухолей или предотвращающих ее развитие.

Основная внутриклеточная мишень производных ауреоловой кислоты – ДНК. Нарушения структуры и функций ДНК в результате комплексообразования являются пусковым механизмом цитотоксичности производных ауреоловой кислоты. Таким образом, определение констант комплексообразования

производных ауреоловой кислоты с двухцепочечной ДНК и изучение физико-химических характеристик таких комплексов в зависимости от структуры соединений предоставляет экспериментальную основу для целенаправленного синтеза новых соединений указанного химического класса.

Повышенная активность семейства транскрипционных факторов Sp является часто встречающимся и критическим показателем при развитии рака, отвечающим за рост опухоли, ее метастазирование и ангиогенез [1]. Сайт связывания транскрипционного фактора Sp1, взаимодействующего с GC-обогащенными сайтами в регуляторных областях генов (в т. ч. онкогенов) – важная мишень анти-транскрипционного эффекта ауреоловой кислоты и ее аналогов, так как антибиотики связываются с этим сайтом и снижают Sp1-зависимую транскрипцию [2]. Производные ауреоловой кислоты селективно связываются с GC-парами в малой бороздке двойной спирали ДНК [4-6]. Эти участки могут являться сайтами связывания транскрипционных факторов, таких как Sp1. По этой причине изучение термодинамических и кинетических характеристик взаимодействия представителей класса ауреоловой кислоты с GC-богатыми олигонуклеотидами, несущими сайты связывания транскрипционных факторов, таких как Sp1, NFAT, и видоизмененными олигонуклеотидами важно для углубления представлений о механизмах цитотоксичности соединений указанного химического класса.

В клетке ДНК упакована в высокоорганизованную структуру в виде хроматина [7]. Одной из систем, моделирующих ДНК в условиях ее высокой компактизации, является холестерическая жидкокристаллическая дисперсия на основе дцДНК (хжкд-ДНК) [8]. Изучение физико-химических параметров связывания физиологически-активных соединений ДНК-направленного действия с хжкд-ДНК представляет особый интерес с точки зрения выяснения характера взаимодействия антибиотиков с ДНК в клетке.

Данная работа посвящена количественному исследованию комплексообразования ДНК с производными противоопухолевого антибиотика оливомицина А (LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840,

LCTA-1498, LCTA-1599). Также были исследованы количественные характеристики взаимодействия оливомицина А (LCTA-254) с олигонуклеотидом, несущим сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT (Sp1/NFAT), и двумя его видоизмененными аналогами (Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2). Было изучено влияние оливомицина А (LCTA-254) на структуру холестерической жидкокристаллической дисперсии на основе дцДНК (хжкд-ДНК).

Цель работы – изучение влияния структуры аналогов оливомицина А на физико-химические характеристики этих антибиотиков и их комплексов с ДНК.

В соответствии с указанной целью были поставлены **следующие задачи**:

- исследовать влияние *O*-ацильных заместителей А-олиозы и Е-оливомикозы оливомицинов на процесс комплексообразования этих соединений с дцДНК и физико-химические характеристики этих комплексов;
- исследовать влияние заместителей в боковой цепи агликона оливомицина А на процесс комплексообразования с дцДНК и параметры комплексов;
- количественно охарактеризовать взаимодействие оливомицина А с олигонуклеотидом, несущим сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и его видоизмененными аналогами с заменами отдельных нуклеотидов;
- определить кинетический механизм реакции комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом, несущим сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и его видоизмененными аналогами;
- определить константы скоростей реакции комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом, несущим сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и его видоизмененными аналогами;
- исследовать комплексообразование оливомицина А с холестерической жидкокристаллической дисперсией на основе дцДНК.

Научная новизна

Впервые установлено влияние заместителей в боковой цепи агликона и *O*-ацильных заместителей А-олиозы и Е-оливомикозы оливомицина А на константы комплексообразования с дцДНК и цитотоксичность. Впервые определены

константы комплексообразования и константы скоростей реакций комплексообразования оливомицина А и олигонуклеотида, несущего сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и двух аналогов с изменениями отдельных азотистых оснований. Впервые установлено комплексообразование оливомицина А в отсутствие ионов магния с высокоорганизованными структурами на основе дцДНК, а именно холестерической жидкокристаллической дисперсией (хжкд-ДНК). Накопление оливомицина А в структуре хжкд-ДНК приводит к переходу из холестерической формы дисперсии в нематическую.

Практическая значимость

Впервые полученные количественные данные (константы комплексообразования с ДНК, значения квантовых выходов, константы скоростей реакции и др.) для ряда аналогов оливомицина А формируют фундаментальные основы для рационального дизайна новых лекарственных средств данного химического класса. Результаты исследования комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом, несущим сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и его аналогами позволили выявить высоко специфическую мишень действия оливомицина А. Обнаруженное влияние оливомицина А на упорядоченные структуры на основе ДНК, характеризующееся изменением организации жидкокристаллической дисперсии, дает представление о взаимодействии антибиотика с ДНК в ее нативном состоянии внутри клеток.

Полученные данные служат основой для создания новых лекарственных средств и могут позволить улучшить уже существующие селективные мишень-направленные противоопухолевые препараты на основе оливомицина А.

Апробация работы

Работа представлена на следующих научных конференциях: Международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗЫ, Москва, Россия, (2011, 2012); Anticancer Agents Research Congress, Antalya, Turkey (2011); 1st International conference on Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks – Design and Applications (FB3), Gothenburg, Sweden (2012); 4th Photochemistry

Summer School 2012 on «Photochemistry, Fundamentals and Applications», Wijk aan Zee, Netherlands (2012); 38 FEBS Congress «Mechanisms in Biology», Saint-Petersburg, Russia (2013).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК, 2 статьи в сборниках трудов конференций, 4 тезиса докладов конференции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Заместители, как сахаридных цепей, так и боковой цепи агликона, производных оливомицина А существенно влияют на способность этих соединений к комплексообразованию с ДНК.
2. Сайт связывания транскрипционного фактора Sp1 является высокоспецифичной мишенью оливомицина А. Изменение состава нуклеотида приводит к существенному изменению характеристик комплексообразования.
3. Комплексообразование оливомицина А с ДНК в составе холестерической жидкокристаллической дисперсии приводит к нарушению пространственной организации дисперсии.

1. Литературный обзор.

1.1 Типы комплексообразования различных лигандов с ДНК.

1.1.1 Особенности структуры двойной спирали, определяющие основные закономерности взаимодействия лигандов с ДНК.

Перед тем как рассматривать образование комплексов различных соединений с ДНК, полезно вспомнить основные структурные особенности двойной спирали. На рисунке 1 показан хорошо известный структурный мотив В-формы ДНК. В-форма ДНК реализуется в относительно широком диапазоне физиологических условий в растворе и в кристаллическом состоянии при высокой относительной влажности.

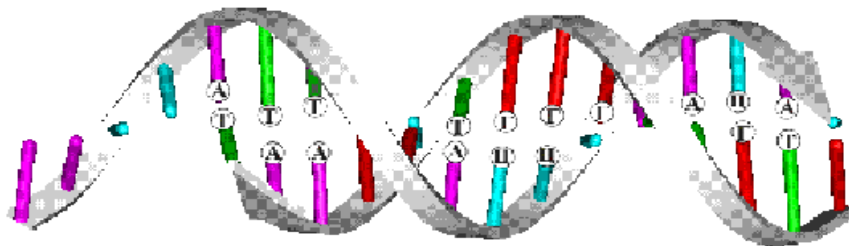


Рисунок 1. В-форма ДНК

При повышении ионной силы (до концентраций Na^+ или K^+ порядка 1 моль/л и выше) узкая бороздка ДНК сужается, и в этом случае говорят о переходе молекулы ДНК из В- в С-форму. Этот переход не является кооперативным и происходит в результате ослабления взаимного отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группами противоположных цепей сахарофосфатного остова (эффект частичной экранировки отрицательных зарядов на фосфатных группах катионами натрия или другими положительными ионами).

При пониженной влажности в кристалле или при содержании этанола в водных растворах более 70% ДНК переходит в А-форму, характеризующуюся наклоном пар оснований к оси спирали (равным примерно 20°) и выдвиганием пар оснований от оси спирали в сторону сахарофосфатного остова. При этом «узкая» бороздка расширяется, а «широкая» бороздка сужается столь значительно, что эти названия становятся прямо противоположными размерам бороздок А-формы ДНК (или двойной спирали РНК, которая существует лишь в А-конформации) [9].

Существуют также более экзотические D-, E- и Z-формы двуспиральных полидезоксирибонуклеотидов, для которых характерно повторение определенного нуклеотидного мотива. Z-форма является левоспиральной в отличие от всех остальных правоспиральных (рисунок 2). Точное разбиение на большое число форм структур РНК и ДНК достаточно условно, так как имеют место многочисленные локальные структурные вариации, зависящие от конкретной последовательности пар оснований рассматриваемого участка двойной спирали. В водных растворах ДНК находится в В-форме, поэтому принято считать, что В-форма отвечает состоянию нативной ДНК в клетке.

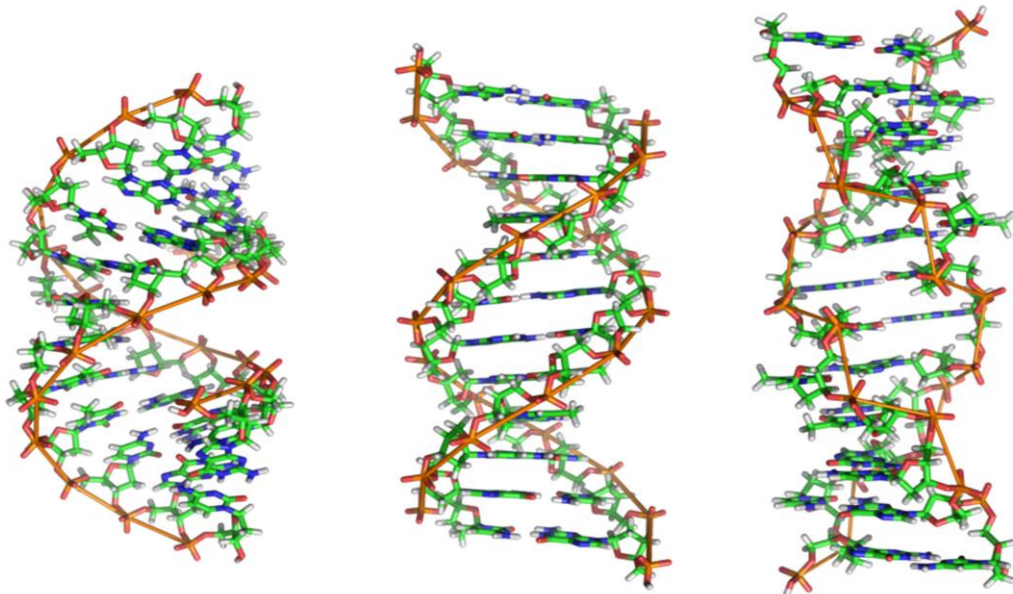


Рисунок 2. А-, В- и Z-формы ДНК (слева направо)

Взаимодействие различных лигандов с ДНК может сопровождаться образованием как ковалентных связей (например, в случае антибиотика

сибирамицина), так и водородных связей (в случае нетропсина, дистамицина А, беренила и других), и стабилизироваться за счет электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. При комплексообразовании лиганда с ДНК в образовании водородных связей могут принимать участие потенциальные донорные и акцепторные группы, как пар оснований, так и самого лиганда [9]. Атомы пар оснований, экспонированные в широкую и узкую бороздки ДНК и потенциально способные образовывать водородные связи с молекулами лиганда, представлены и помечены специальными значками на рисунке 3.

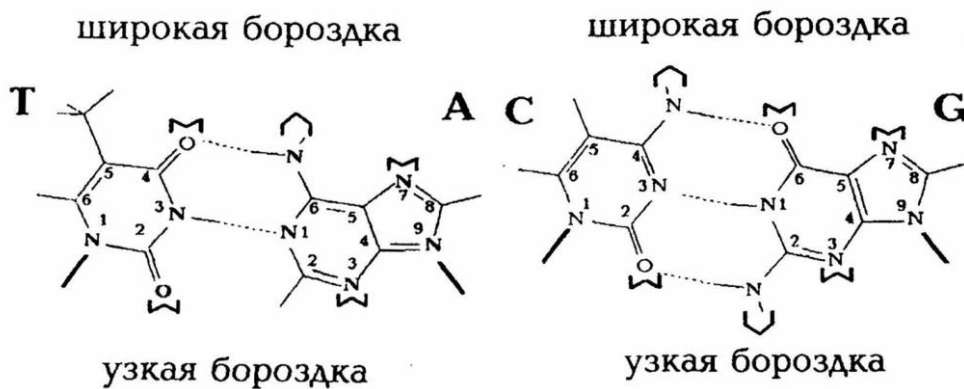


Рисунок 3. Функциональные группы пар оснований, выходящие в узкую и широкую бороздки В-формы ДНК. М – потенциальные акцепторы водородных связей; А – потенциальные доноры водородных связей; (···) – водородные связи.

1.1.1.1 Соединения, интеркалирующие между парами оснований ДНК.

В настоящее время хорошо известно, что многие вещества, в том числе некоторые важные химиотерапевтические соединения связываются с ДНК в соответствии с моделью интеркаляции, согласно которой плоские хромофорные фрагменты молекул лигандов располагаются между соседними парами оснований двойной спирали. При связывании важную роль играют заместители. Располагаясь, как правило, в узкой бороздке ДНК, они обеспечивают дополнительную стабилизацию комплекса за счет образования водородных связей между протон-донорными и протон-акцепторными группами лиганда и нуклеиновых оснований, а также за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных атомов заместителей с отрицательно заряженными

фосфатными группами ДНК. Кроме того, современные исследования структуры комплексов лиганд-ДНК с помощью методов рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле показали, что по мере усложнения заместителей возрастает способность лигандов связываться преимущественно с определенными последовательностями ДНК. Такое сродство к определенным последовательностям ДНК называют сиквенс-специфичностью.

Итак, согласно модели интеркаляции молекула встраивается (интеркалирует) между соседними парами оснований двойной спирали. Пары оснований, раздвигаясь, освобождают место молекуле лиганда и остаются перпендикулярными оси спирали. При этом молекула находится в ван-дер-ваальсовом контакте с парами оснований и, соответственно, параллельна им. Константы связывания интеркаляторов с ДНК составляют обычно $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. Как правило, для интеркаляторов характерна либо слабая GC-специфичность, либо вообще отсутствие специфичности [9]. Типичными интеркаляторами являются акридиновый оранжевый, профлавин, бромистый этидий.

Известны также способы интеркаляции с локализацией части молекулы в бороздках ДНК, как например, интеркаляция со стороны узкой бороздки ДНК (Актиномицин Д), интеркаляция со стороны широкой бороздки ДНК (меногарил). Существуют, кроме того, вещества бис-интеркаляторы (эхиномицин, триостин А) и трис-интеркаляторы (акридиновые тримеры).

Следует отметить, что такие хорошо известные интеркаляторы как профлавин, акридиновый оранжевый, пиронин, метиленовый синий, бромистый этидий способны также локализоваться при связывании в узкой бороздке В-формы ДНК. Как правило, подобные соединения, ароматические фрагменты которых не обладают значительными боковыми группами, имеют слабую специфичность к определенным парам оснований. При низких концентрациях происходит образование комплекса по типу интеркаляции. Однако по мере заполнения мест связывания при увеличении концентрации лиганда взаимодействие с ДНК происходит по типу внешнего присоединения с расположением в бороздках ДНК, преимущественно в узкой [10-12].

Существует ряд красителей, структура которых, даже при наличии плоских ароматических фрагментов, препятствует интеркаляции, например, «метилловый зеленый». По стерическим причинам три бензольных цикла каждого из этих красителей не могут образовывать плоскую структуру, что, по-видимому, препятствует «встраиванию» лиганда между парами оснований. Эти соединения располагаются в узком желобе спирали ДНК [12]. В работе [13] авторы указывают на возможность локализации порфириновой части молекулы, в узкой бороздке с последующим расщеплением цепи ДНК.

1.1.1.2 Соединения с локализацией при связывании в узкой бороздке ДНК.

Существует ряд соединений, которые связываются с нуклеиновой кислотой посредством залегания в узкой бороздке ДНК. Такими, например, являются АТ-специфичные лиганды, содержащие пиррол-карбоксамидные (нетропсин, дистамицин А), бензимидазольные (Хехст 33258, Хехст 33342) и ариламидиновые фрагменты (DAPI, беренил, пентамидин) [14-16]. АТ-специфичность связывания подобных лигандов объясняется выгодностью образования водородных связей между молекулой лиганда и ДНК, отсутствием в АТ-содержащих участках 2-аминогрупп гуанина, являющихся стерическим препятствием для связывания молекул лиганда, а также наличием отрицательного потенциала в узкой бороздке, обеспечивающего выигрыш в энергии взаимодействия при локализации в ней атомов молекулы лиганда, несущих частичный положительный заряд.

ГС-специфичные лиганды, например, митрамицин, хромомицин А₃, оливомицин (производные ауреоловой кислоты) – группа структурно родственных антибиотиков, имеющих частично ароматический хромофор, соединенный с пятью различными сахаридными остатками. Данные соединения обладают противоопухолевой активностью, подавляя синтез РНК и ДНК. Производные ауреоловой кислоты, например, обладают специфичностью к ГС-

богатым последовательностям ДНК, и для эффективного связывания с ДНК им необходимо присутствие ионов Mg^{2+} .

АТ-специфичные лиганды, такие как нетропсин, дистамицин А, Хехст 33258 и DAPI, могут связываться с ДНК посредством димерного «бок-о-бок» связывания в узкой бороздке ДНК. Это означает, что две молекулы лиганда могут одновременно связываться в узкой бороздке ДНК, располагаясь в ней «бок-о-бок» в виде димера. Такое связывание требует слегка расширенной узкой бороздки и обнаруживается как на АТ-, так и на GC-содержащих последовательностях [17, 18]. При этом для дистамицина А, например, было обнаружено, что сначала образуется комплекс со стехиометрией 1:1, т.е. связывается одна молекула лиганда с одним сайтом (сайт – связывающее место – участок ДНК, состоящий из нескольких пар оснований, физически накрываемых связанной молекулой со стороны узкой бороздки). При высоких же концентрациях лиганда вторая молекула занимает тот же сайт связывания, образуется комплекс 2:1, но с гораздо меньшим сродством к ДНК.

1.1.1.3 Соединения с локализацией при связывании в широкой бороздке ДНК.

Большинство низкомолекулярных соединений, для которых характерно связывание с ДНК посредством локализации в бороздках, обладают сродством именно к узкой бороздке. И лишь для немногих соединений есть данные об образовании комплекса в широкой бороздке ДНК. Такими лигандами, например, являются «метиленовый синий» [19] и «метиловый зеленый» [20], а также антибиотик карцинофилин. Причем карцинофилин является бифункциональным алкилирующим агентом, образующим ковалентные сшивки между нитями ДНК со стороны широкой бороздки.

1.1.1.4 Соединения, ковалентно связывающиеся с ДНК.

Данные соединения, локализуясь в одной из бороздок двойной спирали ДНК, могут образовывать ковалентные связи с основаниями ДНК. Примерами таких соединений являются антибиотики: митомицин С, антрамицин, сибиромидин, томаимицин (обладающие GC-специфичностью) [21, 22] и СС-1065, доукармицин А (обладающие АТ-специфичностью) [23, 24]. Связывание подобных лигандов с нуклеиновой кислотой осуществляется путем алкилирования ДНК.

1.1.2 Жидкокристаллические дисперсии на основе двухцепочечной ДНК в водно-полимерных растворах и характеристика их взаимодействия с лигандами.

В настоящее время большой интерес представляет исследование и моделирование физико-химических свойств и биологической активности конденсированных форм нуклеиновых кислот. Это обусловлено тем, что именно в такой форме ДНК находится в составе хромосом и других биологических объектов. Кроме того, сравнительно недавно была обнаружена возможность применения жидких кристаллов ДНК в практических целях, в частности, в нанотехнологии, для создания наноконструкций, обладающих уникальными физико-химическими свойствами, позволяющими использовать такие наноконструкции в качестве «носителей» генетического материала и биологически значимых соединений, связанных с молекулами ДНК, или в биосенсорике, в качестве чувствительных элементов (биодатчиков) сенсорных устройств [25].

1.1.2.1 Типы жидкокристаллических фаз.

Термин «жидкий кристалл» обозначает весьма специфические свойства определенного состояния вещества. Особенности жидкокристаллических фаз, образуемых жесткими линейными молекулами, представлены на рисунке 4.

Нематические жидкие кристаллы (рисунок 4, б). В нематической жидкокристаллической фазе молекулы упорядочены и расположены почти параллельно друг другу. Для нематиков характерна высокая степень дальнего ориентационного порядка, однако дальний трансляционный порядок отсутствует, поскольку центры масс молекул расположены хаотически. Молекулы могут диффундировать во всех трех направлениях и вращаться вокруг оси.

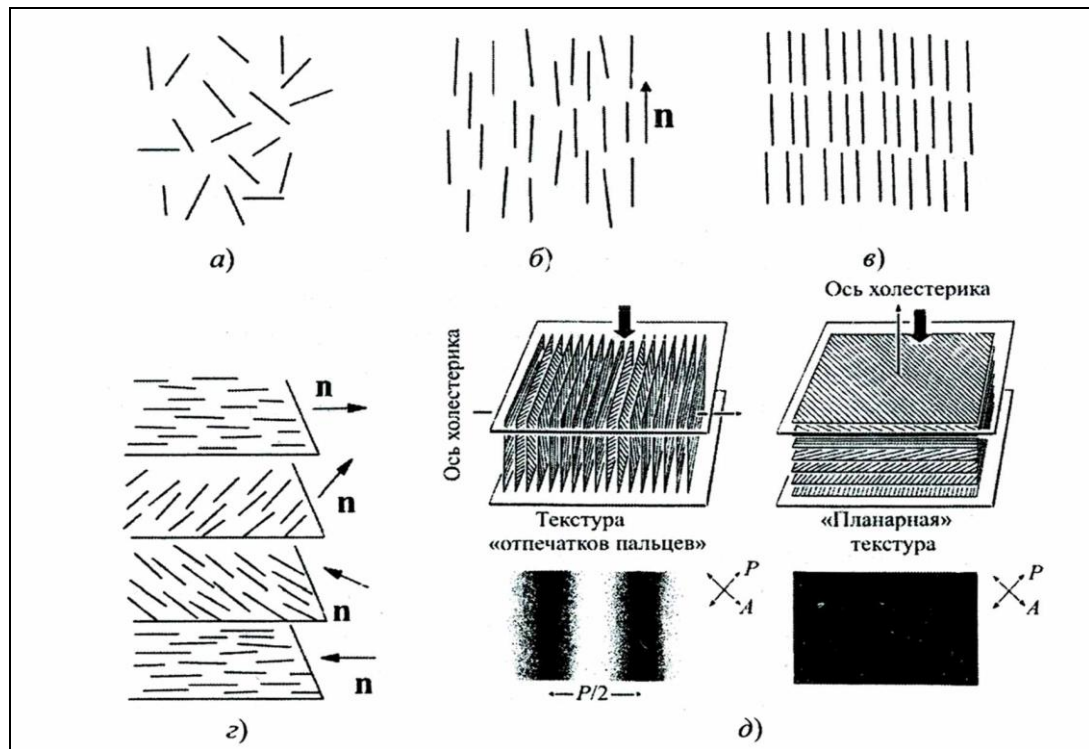


Рисунок 4. Схема, иллюстрирующая расположение молекул в изотропной жидкости (а), нематическом жидком кристалле (б), одном из типов смектических жидких кристаллов (в) и холестерическом жидком кристалле (г); д – схема, иллюстрирующая появление текстур разного типа, характерных для холестерических жидких кристаллов, при наблюдении за свойствами тонкого слоя этих кристаллов при помощи поляризационного микроскопа в направлении, показанном короткой широкой стрелкой.

Характеристикой нематиков может служить специфическая картина тонкого слоя такого жидкого кристалла, наблюдаемая при помощи

поляризационного микроскопа и называемая «текстурой». Текстура определяется макроскопической ориентацией молекул в образце, она позволяет установить молекулярную структуру жидкого кристалла. В случае нематического жидкого кристалла текстура представляет собой комбинацию подвижных «нитей», что и дало название этому типу жидких кристаллов (слово «нематик» от греческого слова «νῆμα» – «нить»).

Смектические жидкие кристаллы (рисунок 4, в). В этой структуре (за некоторыми исключениями) молекулы образуют отдельные эквидистантные слои (порядка длины молекул), разделенные некоторым расстоянием. Существует несколько разных способов расположения молекул в слоях. Иногда внутри слоя молекулы могут располагаться даже беспорядочно, хотя сами слои по-прежнему остаются расположенными на одинаковом расстоянии друг от друга. Однако, как правило, молекулы расположены так, что их длинные оси почти параллельны друг другу и перпендикулярны плоскостям слоев.

Для смектических жидких кристаллов характерен как ориентационный, так и трансляционный дальний порядок в расположении молекул. Молекулы могут диффундировать в двух направлениях: в плоскости слоя и вращаться вокруг оси. При определенных условиях слои могут легко смещаться, скользить друг относительно друга так, как будто между ними имеется «смазка», что и дало название этому типу жидких кристаллов («смегма» – от греческого слова «σμῆμα», что означает «смазка», «мыло»).

Холестерические жидкие кристаллы (рисунок 4, г). Специфической разновидностью нематических жидких кристаллов являются холестерические жидкие кристаллы. В этой структуре молекулы уложены в такие же слои, которые характерны для нематиков (квазинематические слои); в каждом квазинематическом слое средняя ориентация молекул характеризуется вектором \mathbf{n} . В силу анизотропии оптических или геометрических свойств молекул каждый последующий квазинематический слой поворачивается на некоторый угол по отношению к предыдущему, что приводит к повороту «директора» (среднее направление молекул в слое) на некоторый угол и, как следствие, к появлению

пространственно-закрученной спиральной структуры, называемой «холестерической». Термин «холестерическая фаза» обусловлен тем, что подобная по свойствам фаза была впервые обнаружена более 100 лет тому назад для производных эфира холестерина австрийским химиком К. Рейнитцером [25].

Для холестериков характерно очень сильное вращение плоскости поляризации, причем величина удельного вращения плоскости поляризации достигает десятков тысяч и даже сотен тысяч градусов на миллиметр, тогда как для обычных оптически активных кристаллов эта величина редко превышает 1000 град/мм.

Следовательно, важнейшими свойствами рассмотренных типов систем является то, что образующие их молекулы сохраняют свою «молекулярную подвижность», характерную для этих молекул в изотропной жидкости, и, кроме того, у молекул появляется «структурная упорядоченность» либо в одном (как у нематиков и холестериков), либо в двух (как у смектиков) (но не в трех, как у реальных кристаллов) измерениях. Именно поэтому (сочетание свойств, характерных для жидкого и кристаллического состояния вещества) позволяет использовать термин «жидкие кристаллы» для обозначения этого специфического состояния молекул.

Жидкие кристаллы легко реагируют на внешние воздействия – свет, механическое давление, изменение температуры, магнитные поля и т. д., а также изменения состава окружающей среды [25].

Таким образом, жидкокристаллическое состояние – это специфическое состояние, в котором веществу присущи одновременно свойства, как жидкости, так и твердого тела; это состояние, в котором многие свойства являются промежуточными между свойствами жидкости и кристалла.

1.1.2.2 Круговой дихроизм дисперсий нуклеиновых кислот и их комплексов с лигандами.

Жидкокристаллические дисперсии ДНК (жкд-ДНК) являются одной из моделей молекулярно-организованных систем на основе нуклеиновых кислот, молекулы ДНК в которых плотно упакованы в квазинематические слои [8, 26]. Добавление ПЭГ и солей вызывает переход дцДНК из изотропного состояния в анизотропное жидкокристаллическое, что выражается появлением так называемой ψ -аномальной полосы [8, 27] в спектрах кругового дихроизма (КД) на длине волны около 270 нм, где поглощают азотистые основания ДНК. Важно отметить, что полоса КД для конденсированной в холестерическую форму ДНК может быть на несколько порядков более интенсивной по сравнению с линейной дцДНК [8, 27], что делает данную систему крайне привлекательной для изучения методом КД.

Подобное состояние характеризуется высокой локальной концентрацией молекул ДНК, что может обеспечивать также высокую локальную концентрацию молекул лигандов в таких жидкокристаллических системах. Согласно специально разработанной теории в структуру хжкд-ДНК может быть внедрено достаточно большое количество молекул биологически-активных соединений, и при этом не происходит разрушения этой структуры [28].

Если частицы хжкд-ДНК сформированы из двухцепочечных молекул ДНК, которые связаны с соединением, жестко фиксированным по отношению к длинной оси этой молекулы («внешним хромофором», имеющим полосу поглощения, не совпадающую с полосой поглощения азотистых оснований ДНК), то в спектре КД появляются две аномальные полосы. При этом при малой концентрации «внешнего» хромофора, вводимого в структуру частиц хжкд-ДНК, упаковка молекул ДНК в частицах хжкд-ДНК не будет меняться. Такая ситуация возможна, в частности, при интеркаляции (встраивании) между парами оснований ДНК окрашенных биологически активных соединений, в частности антибиотиков антрациклинового ряда, которые взаимодействуют с молекулами ДНК,

образующими частицы хжкд-ДНК. Поскольку все положения теории КД распространяются как на хромофоры ДНК, так и на «внешние» хромофоры, вводимые в структуру частиц хжкд-ДНК, то в данном случае появляется две полосы, расположенные в разных областях спектра КД. По знакам данных полос относительно друг друга можно судить о типе образующегося комплекса между лигандом и ДНК.

Совпадение знаков полос свидетельствует о том, что молекулы антибиотиков расположены по отношению к длинной оси молекулы ДНК точно так же, как расположены пары оснований, т. е. угол между плоскостью молекул «внешних хромофоров» и длинной осью молекулы ДНК близок к 90° . Такое совпадение знаков двух аномальных полос в спектрах частиц хжкд-ДНК, расположенных в разных областях спектра, возможно лишь в том случае, если молекулы «внешнего хромофора» встраиваются (интеркалируют) между парами азотистых оснований ДНК.

Если в результате действия физических или химических факторов происходят сильные нарушения вторичной структуры исходной молекулы ДНК, то аномальные полосы в спектре КД частиц хжкд-ДНК начинают уменьшаться, вплоть до полного их исчезновения. Также, ранее было показано, что при взаимодействии с антибиотиками антрациклинового ряда [29-32] и платина-содержащими антибиотиками [33-35] холестерическая структура хжкд-ДНК может нарушаться, что может определять биологическую активность данных групп соединений.

1.2 Антибиотики ряда ауреоловой кислоты. Структура и свойства.

Оливомицины, абурамицины (хромомицины) и ауреоловая кислота (митрамицин) составляют группу антибиотиков ряда ауреоловой кислоты, активных в отношении грамположительных бактерий и ряда злокачественных новообразований; к ним примыкает также структурно родственный, но антибиотически малоактивный метаболит хромоцикломицин [36-38]. Эти

соединения продуцируются различными видами бактерий streptomycete и относятся к числу природных веществ, обладающих противоопухолевым действием. Родоначальник этой группы, ауреоловая кислота (митрамицин), была открыта в 1953 году [36] (структура митрамицина была впервые установлена при взаимодействии с ДНК и подтверждена в дальнейшем с использованием ЯМР и масс-спектрометрии), а в последующие годы были описаны абурамицин, антибиотики LA-7017, M5-18903, 24-10, NSC A-649, хромомицин, оливомицин, антибиотики SK-229, П296, 3014, 7193, 6604-9А. Все упомянутые соединения являются гликозидами, содержащими четыре или пять моносахаридных остатков, и имеют характерные агликоны. Оливин, агликон оливомицинов, и хромомицинон, агликон абурамицинов и ауреоловой кислоты, представляют собой полифункциональные тетрагидроантрацены с диоксикетонной боковой цепью и различаются лишь метильной группой в ароматическом ядре. Углеводные компоненты соединений этой группы тоже структурно близки: они являются 2,6-дидезоксиальдогексозами и различаются наличием *O*-ацильных и *O*-или *C*-метильных остатков [36].

Все эти вещества обладают сходным спектром антимикробного действия. Наиболее интересным и важным из их медико-биологических свойств оказалась противоопухолевая активность, стимулировавшая широкое биологическое изучение этих веществ. Результаты исследования на противоопухолевую активность, полученные, главным образом, на оливомицине, хромомицине и митрамицине, показали, что эти антибиотики, несомненно, эффективны против ряда злокачественных опухолей и могут использоваться в клинической практике [36, 39, 40]. В основе их цитотоксичности лежит ингибирование ДНК-зависимого синтеза РНК путем образования устойчивых комплексов с ДНК-матрицей [37].

В химическом отношении антибиотики этой группы долгое время оставались неизученными, за исключением оливомицина и хромомицина. Химическое изучение оливомицина проводилось, начиная с 1962 года в институте по изысканию новых антибиотиков АМН СССР, а с 1963 года – также в Институте химии природных соединений АН СССР. В результате исследований,

проведенных группой Берлина Ю.А., были выделены четыре близкородственных оливомициновых антибиотика-гликозида – оливомицины А, В, С и D (переход от оливомицина А к оливомицинам В, С и D заключается в изменении характера ацилирования и длины одной из углеводородных цепей), установлено строение общего для них агликона, оливина, и углеводов компонентов и полностью выяснено расположение этих структурных единиц в молекулах оливомицинов. Обилие антибиотиков группы ауреоловой кислоты было сведено к трем близким друг к другу структурным типам – оливомицинам, хромомицинам и ауреоловой кислоте [36, 37].

Оливомицин А (рисунок 5) – антибиотик группы ауреоловой кислоты, продуцируемый лучистым грибом *Actinomyces olivoreticuli*, был выделен и описан Гаузе и соавторами [41].

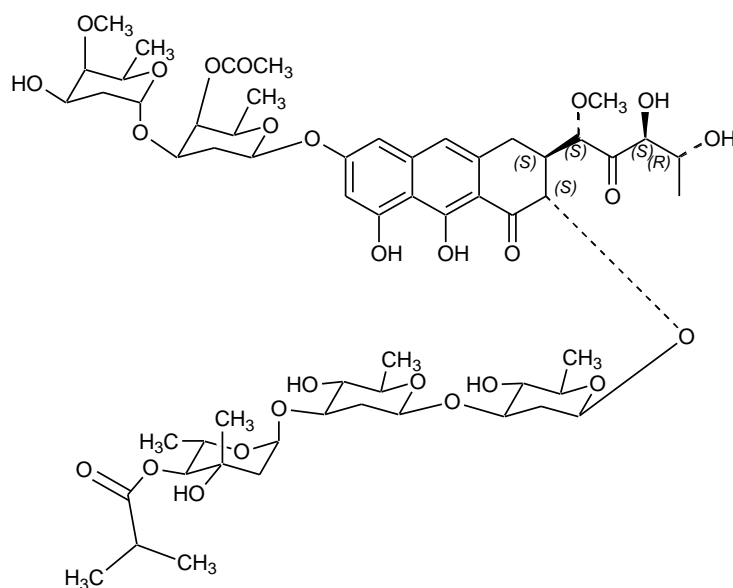


Рисунок 5. Оливомицин А

Использование оливомицина в качестве противоопухолевого средства в медицине и в исследовательской практике в качестве высокоспецифичного флуоресцентного зонда основано на его способности взаимодействовать с ДНК (причем в живых и фиксированных клетках он взаимодействует только с хроматином) [42, 43]. При клинических испытаниях в 80-х годах оливомицин оказался слишком токсичным, но при этом являлся необычно мощным ингибитором большого числа опухолей, в том числе имеющих молекулярные

детерминанты анти-апоптоза. Его действие основано на подавлении транскрипции под действием РНК-полимераз I и II и биосинтеза ДНК [43].

Следует обратить внимание на данные Хаясака и соавторов, указывающих на существенную роль сахарных остатков во взаимодействии хромомицина A_3 с ДНК: по мере отщепления сахарных остатков константа связывания антибиотика с ДНК уменьшается, и для агликона оливомицина – оливина – зарегистрировать взаимодействие с ДНК не удалось [44].

Температура плавления ДНК при образовании комплекса с оливомицином практически не изменяется, не изменяется также ее вязкость и коэффициент седиментации. По литературным данным оливомицин А не вызывает раскручивания суперспирализованной ДНК, а угол наклона плоскости хромофора агликона относительно оси спирали составляет $59 \pm 2^\circ$ [45]. Эти данные показывают, что механизм взаимодействия оливомицина с ДНК – неинтеркаляционный.

В силу того, что ДНК является одной из важнейших мишеней противоопухолевой терапии, оливомицин А использовался, как антинеопластический препарат в лечении опухолей яичка (тератобластома, эмбриональный рак), миндалин, хорионэпителиомы матки, саркомы мягких тканей. Детальное изучение механизма гибели клеток под действием оливомицина А показало, что препарат индуцирует апоптоз. При этом гибель клеток при действии оливомицина А сопровождалась выраженным нарушением целостности ДНК [43].

Таким образом, оливомицин А обладает важными свойствами: вызывает апоптоз опухолевых клеток человека разной тканевой принадлежности, подавляет генную транскрипцию [43].

Хромомицин A_3 и митрамицин (рисунок 6 и рисунок 7) продуцируются *Streptomyces griseus* и *Streptomyces plicatus*, соответственно. Их противоопухолевые свойства могут быть вызваны ингибиторными воздействиями антибиотиков на репликацию и транскрипцию опухолевых клеток. Они являются потенциальными ингибиторами нейронного апоптоза, вызванного окислительным

стрессом или противоопухолевым антибиотиком камптотецином, при этом механизмом апоптоза предположительно является ингибирование связывания факторов транскрипции Sp1 и Sp3 с родственной им 'G-C' ячейкой [3, 46-50].

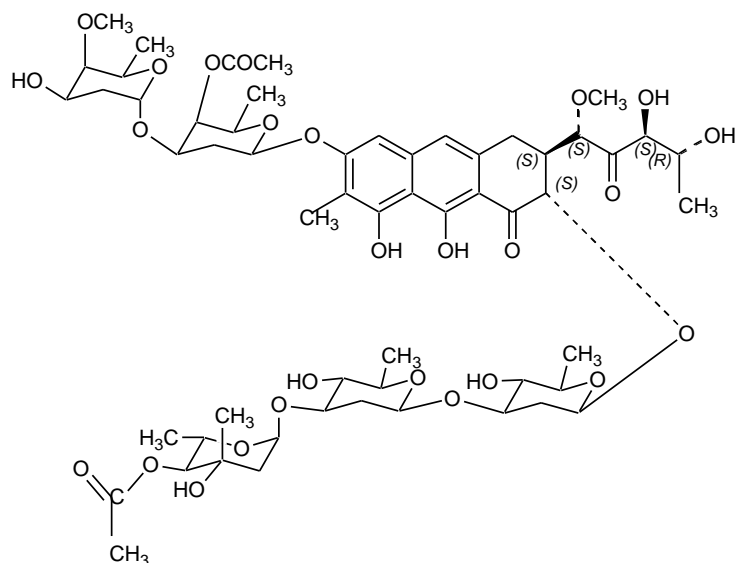


Рисунок 6. Хромомицин А₃

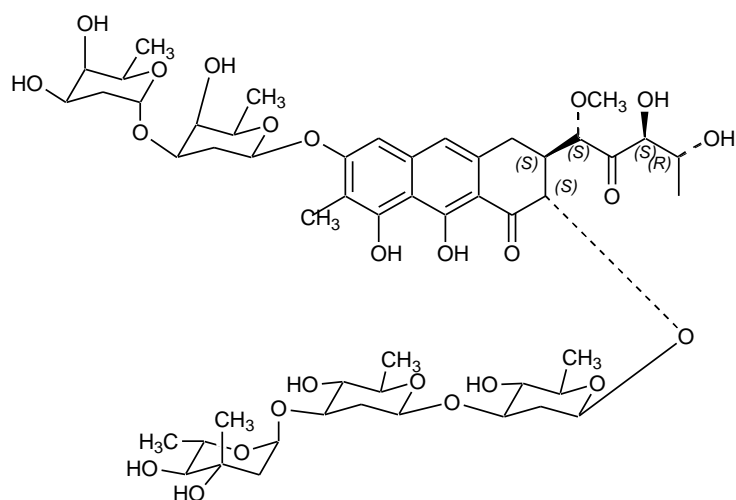


Рисунок 7. Митрамицин (ауреоловая кислота)

Бианчи и соавторы показали, что митрамицин и хромомицин А₃ являются мощными индукторами эритроидной дифференциации клеток K562 путем связывания с промотором человеческого γ -глобина и изменения структуры белка, связанного с этим промотором [51].

Сравнение противоопухолевой активности оливомицина А и хромомицина А₃ в экспериментах *in vivo* на мышинной лимфосаркоме LY01 выявило, что химиотерапевтический индекс (LD50/DIT50) оливомицина А (2,35) более

приемлем, нежели химиотерапевтический индекс хромомицина A_3 (0,99) [52]. Сравнительное изучение ингибиторного эффекта оливомицина А, хромомицина A_3 и митрамицина против перевиваемой лейкемии мышей La показало, что аналогичный противоопухолевый эффект может быть достигнут при более низких дозах оливомицина А по сравнению с дозами других антибиотиков семейства ауреоловой кислоты.

Клинические исследования митрамицина и оливомицина А показали, что эти антибиотики показывают хорошие результаты при лечении тестикулярных опухолей. Однако эти антибиотики обладают такими побочными эффектами, как токсические воздействия на ЖКТ, печень, почки и костный мозг. Основным токсическим эффектом, ограничивающим применение митрамицина, оказался геморрагический диатез, связанный с острой тромбоцитопенией. Важно, что при применении оливомицина А геморрагический диатез не наблюдался. А поскольку оливомицин А обладает наилучшим химиотерапевтическим индексом среди антибиотиков семейства ауреоловой кислоты, то может быть рассмотрен в качестве лучшего образца для разработки новых полусинтетических аналогов ауреоловой кислоты с повышенными химиотерапевтическими индексами и более низкой токсичностью по сравнению с исходным антибиотиком [53].

1.2.1 Типы комплексов антибиотиков ряда ауреоловой кислоты с ДНК.

Митрамицин, хромомицин A_3 , оливомицин (производные ауреоловой кислоты) являются GC-специфичными лигандами. Взаимодействие с GC-парами в узкой бороздке ДНК является важнейшей особенностью антибиотиков данного ряда [54]. Взаимодействие оливомицина с глюкозилированной ДНК фага T_2 , широкая бороздка которой занята остатками глюкозы, свидетельствует о том, что молекула антибиотика располагается в узкой бороздке спирали ДНК [36]. Важно отметить, что число мест связывания возрастает с увеличением содержания GC-пар в ДНК. Оливомицин реагирует с аминогруппами гуанина, экспонированными в малый желоб ДНК [9, 55-57].

Комплексы производных ауреоловой кислоты с ДНК обладают медленным временем диссоциации (время полураспада комплекса при 20°C более 100 минут). Для хромомицина А₃, в частности, было установлено определяющее влияние заместителей в сахаридных цепях на стабильность комплекса с ДНК. Потеря одного из сахаров значительно уменьшает прочность и время жизни комплекса [44].

Для эффективного связывания с ДНК производным ауреоловой кислоты необходимо присутствие ионов магния. Оливомицин А образует комплекс с ионами магния, гидродинамический объем которого примерно в 2,5 раза меньше, чем у свободной молекулы антибиотика [58, 59].

Согласно данным футпринтинга предпочтительные сайты связывания этих антибиотиков состоят, по крайней мере, из двух последовательных GC-пар, причем последовательность 5'-GC-3' оказалась наиболее предпочтительной [60-62].

Исследования методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа показали, что хромомицин А₃ связывается с дуплексами d(AAGGCCTT)₂ и d(AGGATCCT)₂ со стороны узкой бороздки в виде магний-координированного димера, занимая при связывании на ДНК участок протяженностью в 6 пар оснований (рисунок 8) [4, 5, 63, 64]. В комплексе с ДНК мономеры хромомицина А₃ располагаются в положении «голова-к-хвосту», а ион магния находится в координационной связи с атомами кислорода при атомах С₁ и С₉ обоих хромофоров. Сиквенс-специфичность к GC-сайтам, по-видимому, обусловлена тем, что симметрично расположенные в комплексе ОН-группы при атомах С₈ хромофоров могут образовывать водородные связи с NH₂-группами гуанинов в сайте связывания.

Структура магний-координированного димера митрамицина с дуплексом d(TCGCGA)₂ свидетельствует о ее глобальном сходстве со структурой хромомицинового димера, хотя имеющиеся локальные отличия могут являться причиной уменьшенной сиквенс-специфичности митрамицина относительно последовательностей, примыкающих с обеих сторон к центральному сайту 5'-GC-3' [65, 66].

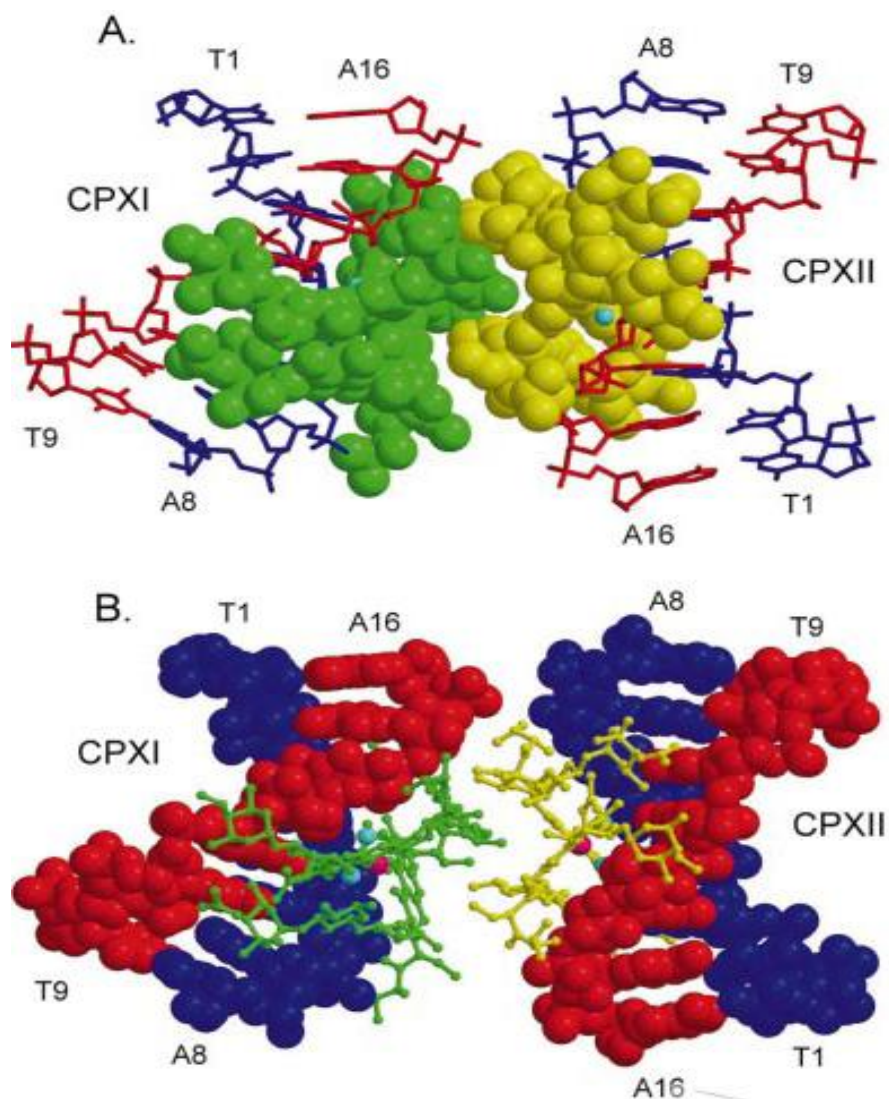


Рисунок 8. Модели комплексов хромомицин A_3 -ДНК; А – хромомициновый димер с изображением ван-дер-ваальсовых атомных радиусов и ДНК в виде каркасной структуры; В – хромомициновый димер в виде каркасной структуры и ДНК с изображением ван-дер-ваальсовых атомных радиусов [63].

Противораковые антибиотики – хромомицин A_3 и митрамицин подавляют клеточные процессы, такие как транскрипция и репликация, путем обратимого связывания с узкой бороздкой двухспиральной ДНК в присутствии бивалентных ионов металла, таких как Mg^{2+} , со специфичностью к GC-основаниям [67-72]. Исследователями были оценены роли двух параметров, а именно размерности бороздки ДНК и гибкости лиганда. Для этой цели были взяты три синтетических олигонуклеотида с различной шириной узкой бороздки: $d(GCGCGCGC)_2$ в В-форме, $d(CCGGCGCCGG)_2$ в В-форме с необычно широкой узкой бороздкой и $(GGGGCCCC)_2$ в А-форме. Взаимодействие комплекса антибиотик-магний с

олигомерами было исследовано с использованием таких оптических методов как спектрофотометрия, спектрофлуориметрия и КД спектроскопия. Было выяснено, что размеры бороздки олигомеров влияют на конформацию связанного лиганда. Различие в жесткости лигандов $(MTM)_2Mg^{2+}$ и $(CHR)_2Mg^{2+}$, отличающихся набором сахаров в структуре молекул, обуславливает различную способность к комплексообразованию этих лигандов с одной и той же последовательностью ДНК. По сравнению с магниевым комплексом хромомидина более высокая гибкость магниевого комплекса митрамицина делает его конформацию в ДНК-связанной форме менее чувствительной к размерности бороздки ДНК [71].

Как показали исследования, митрамицин и хромомидин A_3 могут образовывать два различных типа комплексов с ионами Mg^{2+} , а именно комплекс I с соотношением антибиотика и магния 1:1 и комплекс II с соотношением 2:1 [67, 68, 73]. Способность к комплексообразованию магниевых комплексов митрамицина и хромомидина A_3 с октануклеотидом, содержащим единственный возможный сайт для связывания этих антибиотиков, была исследована при помощи таких оптических методов как спектрофотометрия, спектрофлуориметрия и КД. Несмотря на присутствие двух структурных частей антибиотика в комплексе типа II, по сравнению с комплексом I, с одной молекулой описанного октамерного дуплекса во всех случаях связывается одна молекула комплекса. Это свидетельствует о различии типов связывания комплексов антибиотиков I и II с олигомерной ДНК, при этом энергия взаимодействия также зависит от природы антибиотиков. Спектральное исследование с анализом термодинамических параметров и параметров связывания показало, что для распознавания комплексами I и II антибиотиков октануклеотида достаточно наличия в составе дуплекса одного GpC участка, даже когда он с двух сторон окружен AT-основаниями, с которыми комплексы антибиотиков не связываются [73].

Также было изучено взаимодействие хромомидина A_3 и митрамицина с полинуклеотидами поли(dG-dC).поли(dC-dG), представленным В-формой ДНК и поли(dG).поли(dC), представленным А-формой ДНК, в присутствии ионов магния. Эксперименты были проведены с комплексами антибиотик- Mg^{2+} типов I

и II. Было выяснено, что комплекс типа I связывается как с А-формой, так и с В-формой ДНК без значительного различия между ними (как для митрамицина, так и для хромомицина А₃). Комплекс типа II распознает А- и В-формы ДНК различным образом. Это наблюдение позволяет предположить, что сиквенс-специфичность, показанная данным комплексом, является следствием различия таких параметров, как размер бороздки ДНК и доступность аминогруппы гуанина. Также было обнаружено, что параметры комплексообразования магниевых комплексов типа II митрамицина и хромомицина А₃ с одним и тем же полинуклеотидом существенно отличаются. Это подчеркивает важную роль сахаридных остатков при образовании комплекса антибиотик-магний с ДНК [74].

Хромомицин А₃ и митрамицин имеют различные сахаридные остатки. С помощью модельного олигомера d(TAGCTAGCTA)₂, содержащего два частично перекрывающихся потенциальных сайта связывания, была исследована роль сахаров в распознавании ДНК митрамицином и хромомицином А₃. Спектральное исследование совместно с анализом параметров связывания антибиотика с олигомером, а также термодинамических параметров комплексообразования, показали, что комплекс митрамицин-магний связывается с дуплексом в соотношении 2:1, тогда как комплекс хромомицин-магний – в соотношении 1:1. Анализ кривых плавления олигомера в отсутствие и в присутствии двух лигандов показал, что комплекс митрамицин-магний стабилизирует дуплекс. Комплекс хромомицин-магний стабилизирует только половину олигомера и дестабилизирует другую половину. Доказательством этого факта является наличие двух пиков на дифференциальной кривой плавления, где первый пик находится ниже температуры плавления свободного олигомера, а второй пик – выше. Исходя из этого были сделаны выводы о роли сахаров – присутствие таких составных частей как метокси- или ацетокси-группы в А-, В- или Е-сахарах хромомицина понижает гибкость лиганда хромомицин-магний. Следовательно, его комплексообразование с первым сайтом связывания в олигомере приводит к частичному раскручиванию и дестабилизации второго сайта связывания. Таким образом, комплекс хромомицин-магний не способен взаимодействовать с двумя

сайтами связывания олигомера одновременно. В противоположность хромомицину комплекс митрамицин-магний имеет большую гибкость. Это способствует осуществлению конформационных изменений магниевого димера, что делает возможным связывание комплекса митрамицин-магний с олигомером в соотношении 2:1. Таким образом, природа заместителей в остатках сахаров является основным фактором, обуславливающим различие в распознавании ДНК данными антибиотиками [74].

1.2.2 Спектроскопия кругового дихроизма соединений ряда ауреоловой кислоты и их комплексов с ДНК.

Хромомицин A_3 является оптически активным. На рисунке 9 показаны спектры КД хромомицина A_3 в отсутствие (А) и в присутствии (В) олигонуклеотидного дуплекса при добавлении ионов Mg^{2+} .

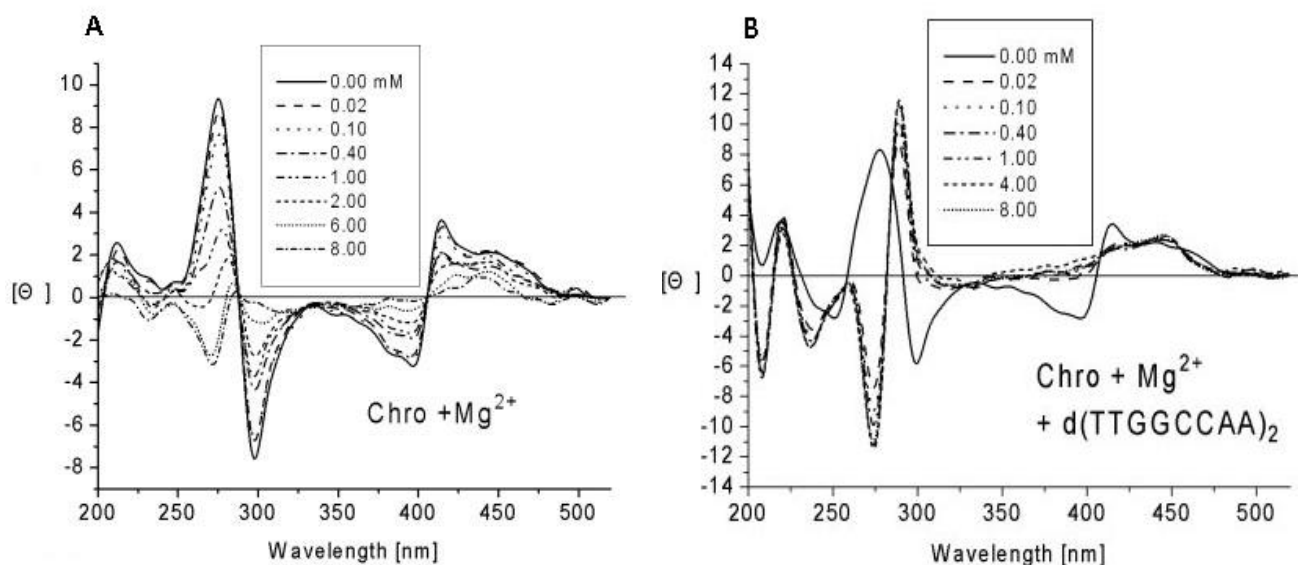


Рисунок 9. Спектры КД хромомицина A_3 в отсутствие (А) и в присутствии (В) октануклеотида $d(TTGGCCAA)_2$ при добавлении ионов Mg^{2+} [63].

В обеих вышеупомянутых системах добавление Mg^{2+} приводит к схожим изменениям в спектрах КД, которые заключаются в уменьшении амплитуд положительных и отрицательных полос при 400 и 413 нм. Однако спектральные изменения этих двух систем в УФ-области отличаются. В присутствии дуплекса

добавление ионов Mg^{2+} вызывает увеличение интенсивности положительной полосы при 295 нм, тогда как в отсутствие олигонуклеотида наблюдается уменьшение интенсивности отрицательной полосы при 300 нм. Спектры КД выступают хорошими индикаторами конформационных изменений ДНК в результате ее связывания с антибиотиком [63].

На рисунке 10 представлены спектры КД комплексов типа II митрамицина ($(MTR)_2Mg^{2+}$) и хромомицина ($(CHR)_2Mg^{2+}$) в присутствии олигомеров в концентрациях, при которых весь антибиотик находится в комплексе с олигонуклеотидом. Основным изменением спектров КД, характеризующим связывание обоих лигандов с олигонуклеотидами, является гиперхромизм полосы спектра в области поглощения лигандов. Однако при сравнении спектров $(CHR)_2Mg^{2+}$ и $(MTR)_2Mg^{2+}$, связанных с олигомером, можно выявить ряд отличий, как формы спектров, так и интенсивности пиков. Спектры КД лиганда ($(CHR)_2Mg^{2+}$ или $(MTR)_2Mg^{2+}$) в комплексе с олигомерами резко отличались в зависимости от размера малой бороздки. Влияние комплексообразования с вышеупомянутыми олигонуклеотидами на свойства спектров КД более четко выражено в случае хромомицина A_3 . Таким образом, можно сделать вывод о том, что геометрия лиганда $(CHR)_2Mg^{2+}$ более чувствительна к размерности бороздки олигомера [71]. Этот факт также подтверждается сравнением спектров КД комплексов двух лигандов ($(CHR)_2Mg^{2+}$ или $(MTR)_2Mg^{2+}$) с полимерными ДНК вида $poly(dG-dC) poly(dG-dC)$ and $poly(dG) poly(dC)$ [71, 75].

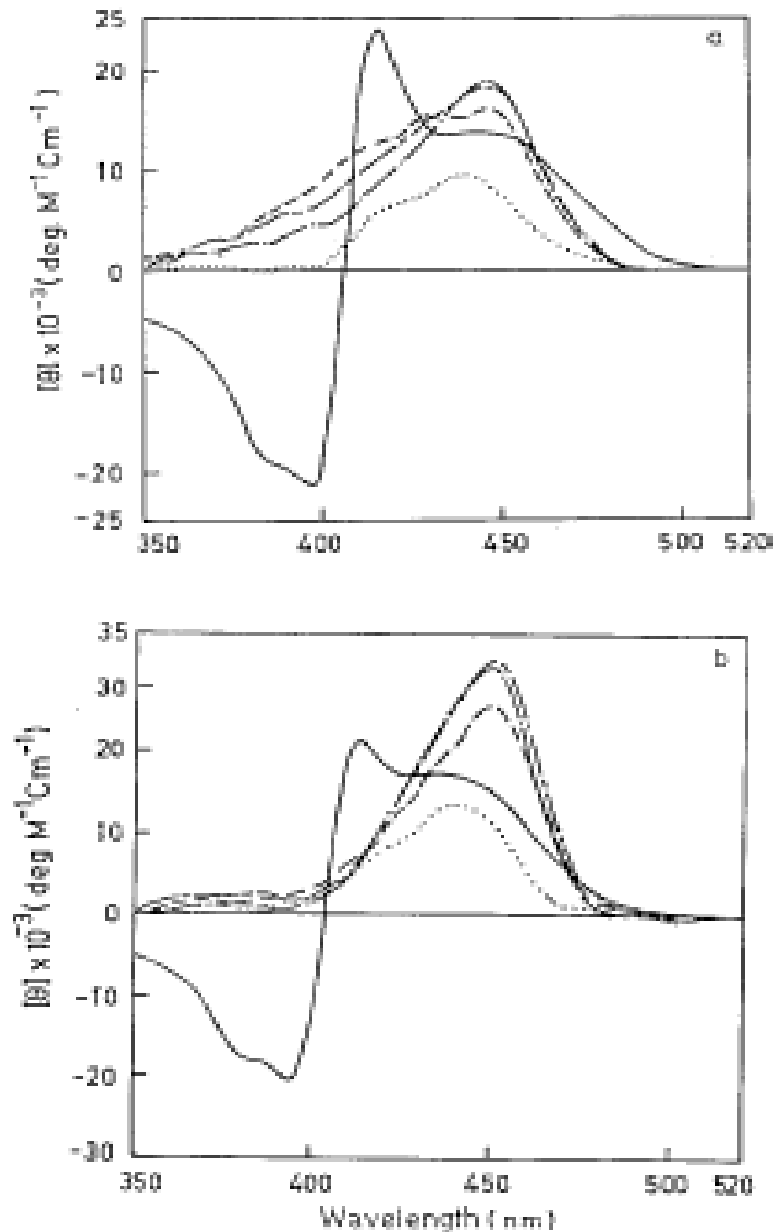


Рисунок 10. Спектры КД митрамицина (MTR) и хромомицина А₃ (CHR) в различных условиях в 20мМ трис-НСl буфере при рН=8 и 25°С. (а) CHR ([CHR] = 20 мкМ, —); комплекс II ([CHR] = 20 мкМ, [Mg²⁺] = 10 мМ, ...); комплекс II в присутствии насыщающей концентрации d(GCGCGCGC)₂ (330 мкМ, — · —), d(CGGGCGCCGG)₂ (470 мкМ, — — —) и d(GGGGCCCC)₂ (300 мкМ, — — —). (б) MTR ([MTR] = 20 мкМ, —); комплекс II ([MTR] = 20 мкМ, [Mg²⁺] = 10 мМ, ...); комплекс II в присутствии насыщающей концентрации d(GCGCGCGC)₂ (375 μМ, — · —), d(CGGGCGCCGG)₂ (470 μМ, — — —) и d(GGGGCCCC)₂ (335 μМ, — — —) [71].

1.2.3 Зависимость между структурой и антибиотической активностью соединений ряда ауреоловой кислоты.

Переход от оливомицина А к оливомицинам В, С и D, заключающийся в изменении характера ацилирования и длины одной из углеводородных цепей, сопровождается постепенным уменьшением антибактериальной активности [76]. Сходная тенденция, хотя и менее выраженная, наблюдается и в ряду абурамицинов, которые содержат те же сахара, но отличаются наличием С-метильной группы в ароматическом ядре [77]. Поскольку абурамицины в среднем несколько активнее соответствующих оливомицинов, то дополнительная С-метильная группа несомненно оказывает определенное влияние на биологические свойства этих антибиотиков. В то же время такое значительное изменение структуры, как окислительная дегградация боковой цепи хромомицина А₃ с утратой трех из пяти углеродных атомов приводит к образованию хромомициновой кислоты, все еще сохраняющей высокую биологическую активность.

В основе биологического действия антибиотиков группы ауреоловой кислоты лежит подавление матричного синтеза РНК. Антибиотики группы ауреоловой кислоты подавляют синтез РНК, образуя прочные комплексы с матричной ДНК. Одной из вероятных причин подавления матричной активности ДНК веществами, образующими с ней комплексы, является увеличение прочности вторичной структуры ДНК, которое препятствует локальному плавлению молекулы ДНК, необходимому при матричном синтезе на двухцепочечной ДНК. Такое представление основано на том, что вещества, оказывающие воздействие на биосинтез нуклеиновых кислот, подобно актиномицину, значительно повышают температуру плавления ($T_{пл}$) ДНК. В присутствии ионов магния антибиотически активные представители группы ауреоловой кислоты повышают $T_{пл}$ ДНК, тогда как малоактивные и неактивные вещества практически не оказывают такого действия [78].

Существует прямая корреляция между антибактериальной активностью соединений группы ауреоловой кислоты и их способностью ингибировать ДНК-зависимый синтез РНК и образовывать комплексы с ДНК [78].

Исследования показывают, что общая гидрофобность молекулы играет определенную роль в связывании антибиотика с ДНК, но еще большее значение имеют число, характер и расположение моносахаридных остатков [37, 44].

2. Материалы и методы исследования.

2.1 Материалы и реактивы.

В качестве лигандов были выбраны производные оливомицина А (рисунок 1):

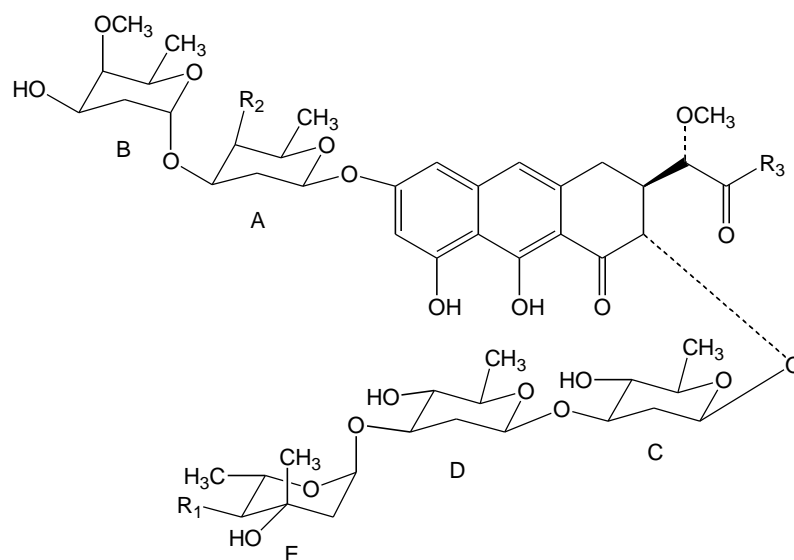


Рисунок 1. Структурная формула производных оливомицина А в общем виде.

Название соединения	R ₁	R ₂	R ₃
LCTA-254	-OCOCH(CH ₃) ₂	-OCOCH ₃	-CH(OH)CH(OH)CH ₃
LCTA-255	-OCOCH(CH ₃) ₂	-OH	-CH(OH)CH(OH)CH ₃
LCTA-1721	-OCOCH ₃	-OCOCH ₃	-CH(OH)CH(OH)CH ₃
LCTA-1839	-OH	-OH	-CH(OH)CH(OH)CH ₃
LCTA-1840	-OH	-OCOCH ₃	-CH(OH)CH(OH)CH ₃
LCTA-1498	-OCOCH(CH ₃) ₂	-OCOCH ₃	-OH
LCTA-1599	-OCOCH(CH ₃) ₂	-OCOCH ₃	-NHC ₂ H ₄ N(CH ₃) ₂

В работе были исследованы процессы комплексообразования лигандов (рисунок 1) с натриевой солью высокоочищенной деполимеризованной ультразвуком ДНК из молок осетровых рыб (salmon sperm DNA), с молекулярной массой $(0,27-0,5) \times 10^6$ Да, без дополнительной очистки (коммерчески доступный препарат ДНК Деринат®). Для создания холестерической жидкокристаллической

дисперсии на основе ДНК применяли полиэтиленгликоль с молекулярной массой 4000 Да (Sigma Aldrich, США) в содержании 17% в соответствии с методикой, описанной в работе [25]. Комплексообразование исследовали также для оливомицина А и олигонуклеотидов с последовательностью пар оснований d(TGGCGGGAAAAAG)₂ (Sp1/NFAT), d(TGTAGGGAAAAAG)₂ (Sp1/NFAT-m1), d(TGTAGGTAAAAAG)₂ (Sp1/NFAT-m2) («Литех», Москва). В исследованиях при помощи метода «внешнего» хромофора использовали красители митоксантрон (Sigma Aldrich, США) и тиазоловый оранжевый (Sigma Aldrich, США). В качестве внутреннего стандарта для измерения квантового выхода использовали антибиотик хромомицин А₃ (Sigma Aldrich, США).

Концентрацию оснований ДНК определяли, пользуясь известным коэффициентом экстинкции $6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Концентрацию олигонуклеотидов рассчитывали исходя из коэффициентов экстинкции, рассчитанных при помощи программного обеспечения OligoAnalyzer 3.1 от Integrated DNA Technologies (США).

В качестве растворителя использовали трис-НСl буфер. Концентрацию ДНК определяли по известному коэффициенту экстинкции и оптической плотности раствора ДНК. Эксперименты были проведены в трис-НСl буфере с концентрацией 0,01М, рН=7,5 в присутствии хлорида магния с концентрацией $5 \times 10^{-2} \text{ M}$.

Концентрации лигандов подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность в экспериментах по поглощению не превышала 1 О.Е., что соответствует концентрации $10^{-5} - 10^{-4} \text{ M}$, и определяли, опираясь на известные коэффициенты экстинкции в этиловом спирте.

В экспериментах по флуоресценции концентрация красителей была значительно меньше, порядка $10^{-7} - 10^{-6} \text{ M}$. Растворы красителей готовили в этиловом спирте и разбавляли трис-НСl буфером. Все растворы готовили непосредственно перед проведением эксперимента и оставляли на 60 минут для установления равновесия.

2.2 Методики.

Исследование комплексообразования перечисленных выше веществ с биомакромолекулами проводилось с помощью спектрофотометрического, спектрофлуориметрического методов, индуцированного кругового дихроизма, метода остановленной струи при 22°C в буферах с физиологическими значениями рН.

2.2.1 Спектрофотометрический метод.

Измерения проводились на спектрофотометре «Shimadzu UV-3101 PC» (Япония) в кварцевых кюветах 10 × 10 мм. Разрешающая способность прибора составляет 0,1 нм, точность волнового числа – 0,1 нм, фотометрическая точность – 0,1 %Т. Спектры поглощения записывали относительно кюветы, заполненной буферным раствором. Шаг измерения составлял 0,1 нм, диапазон измерения – от 220 до 550 нм.

2.2.2 Спектрофлуориметрический метод.

Спектрофлуориметрическим методом получали спектры флуоресценции антибиотиков и их комплексов с ДНК. Для получения спектров флуоресценции применяли спектрофлуориметр «Shimadzu RF-5301 PC» (Shimadzu, Япония). Образец в кварцевой кювете 10 × 10 мм возбуждали светом определенной длины волны, а затем регистрировали свет, излучаемый под углом 90 градусов.

Квантовый выход флуоресценции определяли по методу сравнения со стандартом [79] в соответствии с уравнением 1, приведенным ниже:

$$\Phi_{\text{fl образ}} = \Phi_{\text{fl станд}} \times \frac{S_{\text{fl образ}} \times \varepsilon_{\text{станд}} \times c_{\text{станд}} \times n_{\text{образ}}^2}{S_{\text{fl станд}} \times \varepsilon_{\text{образ}} \times c_{\text{образ}} \times n_{\text{станд}}^2} \quad (1)$$

где $\Phi_{\text{fl образ}}$ – квантовый выход флуоресценции образца, $\Phi_{\text{fl станд}}$ – квантовый выход флуоресценции стандарта, $S_{\text{fl образ}}$ – площадь спектра флуоресценции образца, S_{fl}

$\epsilon_{\text{станд}}$ – площадь спектра флуоресценции стандарта, $\epsilon_{\text{станд}}$ – молярный коэффициент экстинкции стандарта, $\epsilon_{\text{образ}}$ – молярный коэффициент экстинкции образца, $n_{\text{образ}}$ – коэффициент преломления среды образца, $n_{\text{станд}}$ – коэффициент преломления среды стандарта, $c_{\text{образ}}$ – концентрация образца (в М), $c_{\text{станд}}$ – концентрация стандарта (в М).

Внутренним стандартом служил комплекс хромомицина A_3 с ДНК с известным квантовым выходом [79]. Квантовые выходы флуоресценции лигандов в комплексах с ДНК определяли при высоких концентрациях ДНК, т. е. в условиях, когда в буферных растворах лиганды присутствовали только в виде комплексов с ДНК. Спектры флуоресценции соединений и их комплексов с ДНК изучали в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl и 50 мМ $MgCl_2$.

Из кривых зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ДНК в растворе антибиотиков определяли концентрации связанного и свободного лигандов, после чего эти зависимости преобразовывали в координатах Скэтчарда (уравнение 2) [80], чтобы рассчитать константы комплексообразования.

$$\theta/[DNA] = 1/K_a - \theta/K_a \quad (1) \quad (2)$$

$$[DNA]_{\text{free}} = [DNA]_t - [DNA]_b = [DNA]_t - [LCTA]_t \times (I - I_0) / (I_{\text{max}} - I_0)$$

$$[LCTA]_{\text{free}} = [LCTA]_t \times (I_{\text{max}} - I) / (I_{\text{max}} - I_0)$$

$$[LCTA]_b = [LCTA]_t \times (I - I_0) / (I_{\text{max}} - I_0)$$

$$\theta = [LCTA]_b / [LCTA]_t$$

В данных уравнениях K_a – константа связывания, I_0 , I_{max} , I – значения интенсивности флуоресценции, минимальной, максимальной и текущей соответственно, $[LCTA]$ и $[DNA]$ – концентрации красителя и ДНК, индексы b и free соответствуют концентрациям компонентов в связанном и свободном состояниях, соответственно.

2.2.3 Спектроскопия кругового дихроизма.

Круговой дихроизм основан на взаимодействии поляризованного света с хиральными структурами, которые обладают естественной оптической

активностью, при этом регистрируется соответствующая разница поглощений ΔA . В методе кругового дихроизма (КД) используют величину дихроичного поглощения $\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r = \Delta A/(l \cdot c)$, где A – оптическая плотность кругового дихроизма; c – концентрация в моль/л; l – длина оптического пути; и величину эллиптичности $[\theta]$. Эти две величины связаны между собой соотношением $[\theta] = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$. Спектр КД представляет собой зависимость величины $\Delta\varepsilon$ (ΔA) или молекулярной эллиптичности $[\theta]$ от длины волны (λ). В спектре КД в области поглощения оптически активных хромофоров, имеющихся в молекуле, присутствует экстремум, который в зависимости от соотношения между величинами ε_l и ε_r может быть либо положительным, либо отрицательным. Измерения проводились на дихрометре СКД-2М (Троицк, Россия), оборудованном термостатируемой ячейкой, в кварцевых кюветах 10×10 мм с накоплением по 4 измерения на одну точку спектра с шагом измерения спектра 1 нм в диапазоне длин волн от 220 до 750 нм.

2.2.4 Метод остановленной струи.

Метод остановленной струи с флуоресцентной детекцией позволяет отслеживать кинетику взаимодействия биологически-активных соединений с биомакромолекулами в миллисекундном/секундном диапазоне, а также фиксировать промежуточные продукты на основе их флуоресцентных характеристик. В данной работе использовали установку остановленной струи SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания). Минимальный объем каждого реагента реакционной смеси составлял 40 мкл при смешивании в соотношении 1:1. «Мертвый» объем при этом составлял < 30 мкл, «мертвое» время – 1,1 мс. В качестве источника возбуждения использовали 150 Вт ксеноновую лампу с воздушным охлаждением (Xe arc lamp). Возбуждение смеси проводили в ячейке $5,5 \text{ мм} \times 1,5 \text{ мм}$. При детекции флуоресценции использовали специальный фильтр (длина волны максимума пропускания $\lambda > 450 \text{ нм}$).

3. Результаты и их обсуждение.

3.1 Физико-химические свойства аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы и их комплексов с ДНК.

3.1.1 Исследование комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК методом спектрофотометрии.

Последовательное изменение в спектрах поглощения антибиотиков LСТА-254, LСТА-255, LСТА-1721, LСТА-1840, LСТА-1839 при увеличении концентрации ДНК в буферном растворе, содержащем 10 мМ трис-НСl и 50 мМ MgCl₂, свидетельствовало об образовании комплексов лигандов с ДНК. Спектры поглощения комплексов смещены в длинноволновую область по сравнению со спектрами свободных лигандов на 16 нм. Максимумы в спектрах поглощения комплексов LСТА-254, LСТА-255, LСТА-1721, LСТА-1840, LСТА-1839 находятся на длине волны ~ 440 нм, что характерно для комплексообразования производных ауреоловой кислоты с ДНК. Для соединений LСТА-254, LСТА-255, LСТА-1721, LСТА-1840, LСТА-1839 изобестическая точка в спектрах поглощения равновесной смеси исходных реагентов и комплексов лигандов с ДНК находится при 425 нм, что обусловлено, вероятно, наличием одного типа комплекса.

На рисунке 1 представлены спектры поглощения LСТА-254 в 10 мМ трис-НСl буферном растворе с 50 мМ MgCl₂ и в присутствии ДНК. При добавлении ДНК наблюдается батохромный сдвиг максимума спектра на 16 нм, что свидетельствует об образовании комплекса ДНК-LСТА 254.

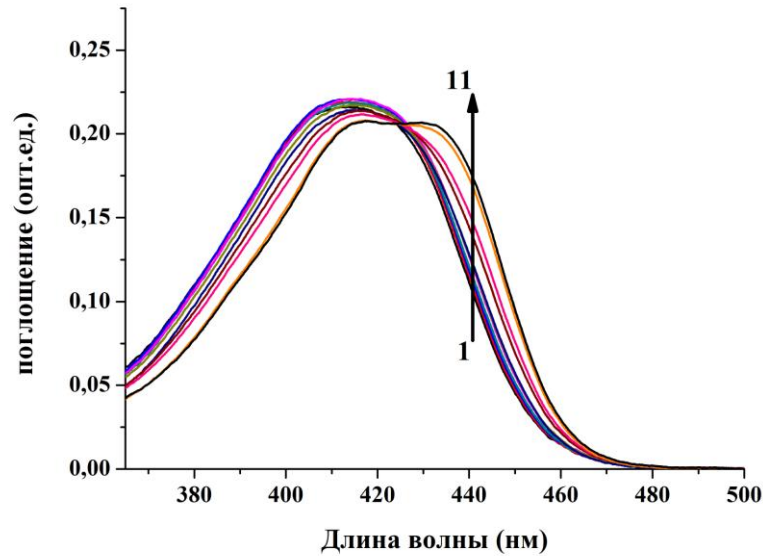
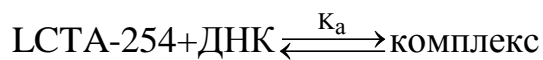


Рисунок 1. Спектры поглощения LСТА-254 (2×10^{-5} М) в 10мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии $MgCl_2$ с концентрацией 5×10^{-2} М при различных концентрациях дцДНК (1 – 0; 2 – 1×10^{-6} ; 3 – 2×10^{-6} ; 4 – 4×10^{-6} ; 5 – 6×10^{-6} ; 6 – 8×10^{-6} ; 7 – 1×10^{-5} ; 8 – 2×10^{-5} ; 9 – 4×10^{-5} ; 10 – 1×10^{-4} ; 11 – 4×10^{-4} М п.о.).

Процессу комплексообразования соответствует равновесие, характеризуемое константой K_a :



Спектры поглощения LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840, которые представлены на рисунке 2, измеряли в присутствии ДНК. Как можно видеть, в спектрах поглощения соединений LСТА-254, LСТА-255, LСТА-1721 в комплексе с ДНК сильно выражено «плечо» в длинноволновой области спектра на 440 нм. В то же время, данное «плечо» слабо проявляется для соединения LСТА-1840 в комплексе с ДНК и практически не выражено для комплекса LСТА-1839-ДНК.

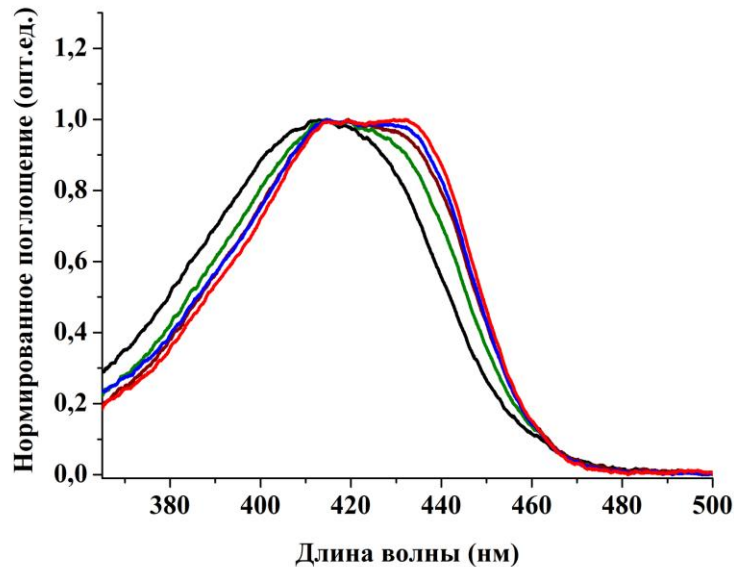


Рисунок 2. Нормированные спектры поглощения LСТА-254 (красный), LСТА-255 (коричневый), LСТА-1721 (синий), LСТА-1840 (зеленый), LСТА-1839 (черный) ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) в 10 мМ трис-НСl буферном растворе (рН=7,5) в присутствии MgCl_2 с концентрацией $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ при концентрации дцДНК $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ п.о.

3.1.2 Исследование взаимодействия аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК методом кругового дихроизма.

Спектры КД LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 и их комплексов с дцДНК регистрировали в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl (рН=7,5) и 50 мМ MgCl_2 . Выявлено значительное возрастание длинноволновой положительной полосы в спектре КД при комплексообразовании с ДНК (1 мМ).

На рисунке 3 приведены спектры КД LСТА-254, LСТА-255, LСТА-1840 и их комплексов с ДНК.

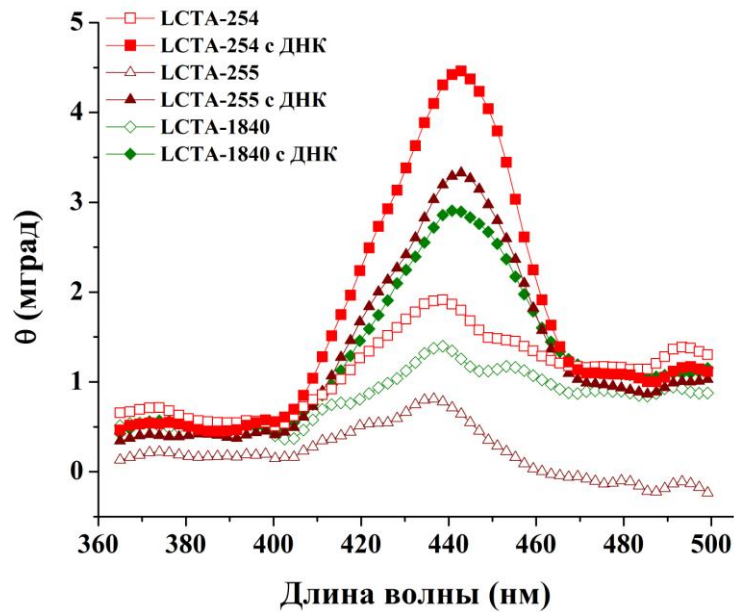


Рисунок 3. Спектры КД LCTA-254 (красный незаштрихованный квадрат), LCTA-255 (коричневый незаштрихованный треугольник) и LCTA-1840 (зеленый незаштрихованный ромб) (1×10^{-5} М) в 10 мМ трис-НСl буфере (рН=7,5) в присутствии 50 мМ $MgCl_2$ и их комплексов с дцДНК ($[ДНК] = 1 \times 10^{-3}$ М п.о.) (заштрихованные красный квадрат, коричневый треугольник и зеленый ромб, соответственно) ($L=1$ см, $T=22^\circ C$).

Выявлено значительное возрастание длинноволновой положительной полосы при комплексообразовании LCTA-254, LCTA-255 LCTA-1840 с ДНК (1 мМ) по сравнению со спектром КД свободных лигандов.

На рисунке 4 приведены спектры КД LCTA-1721, LCTA-1839, зарегистрированные в отсутствии и в присутствии избытка дцДНК, которые свидетельствуют о значительном возрастании длинноволновой положительной полосы спектра КД при комплексообразовании LCTA-1721 с ДНК (1 мМ), в то время как для LCTA-1839 сильного увеличения интенсивности сигнала наведенного КД зафиксировать не удалось.

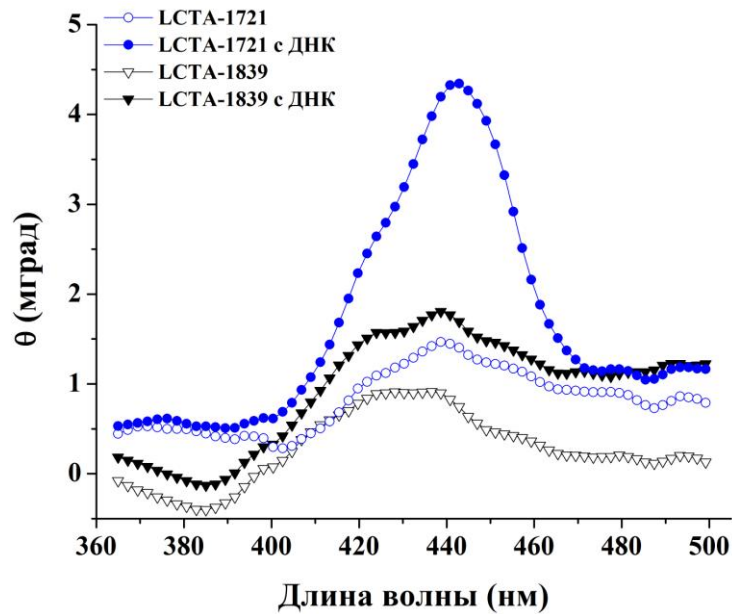


Рисунок 4. Спектры КД LCTA-1721 (незаштрихованный синий круг) и LCTA-1839 (незаштрихованный черный треугольник) (1×10^{-5} М) в 10 мМ трис-НСI буфере (рН=7,5) в присутствии 50 мМ $MgCl_2$ и их комплексов с дцДНК ($[ДНК] = 1 \times 10^{-3}$ М п.о.) (заштрихованные синий круг и черный треугольник, соответственно) ($L=1$ см, $T=22^\circ C$).

Для соединений LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721 наблюдалось значительное возрастание длинноволновой положительной полосы в спектре КД при их комплексообразовании с ДНК (1 мМ) (рисунки 3 и 4). Наибольшее увеличение длинноволновой полосы в спектре КД наблюдается для комплексов LCTA-254:ДНК по сравнению со спектрами КД комплексов LCTA-255 и LCTA-1721 с дцДНК. Длинноволновые максимумы КД в комплексах соединений LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721 совпадают, однако их амплитуды существенно отличаются. Спектры КД комплексов антибиотиков LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721 с дцДНК свидетельствуют о том, что взаимодействие с ДНК вызывает сходные изменения геометрии соединений.

Амплитуды длинноволновых полос в спектрах КД комплексов лигандов с ДНК при прочих равных условиях возрастают в ряду LCTA-1839 < LCTA-1840 < LCTA-255 < LCTA-1721 < LCTA-254, что обусловлено увеличением в данном ряду прочности образующихся комплексов лигандов со спиральной структурой молекулы ДНК. Как итог, более сильное взаимодействие лиганда со спиральной структурой ДНК вызывает больший эффект наведенного КД.

3.1.3 Исследование комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК методом спектрофлуориметрии.

При помощи спектрофлуориметрического метода измерения регистрировали образование комплексов производных оливомицина А LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 с двухцепочечной ДНК. Образование комплексов LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 с двухцепочечной ДНК определяли по увеличению интенсивности спектров флуоресценции на длине волны $\lambda_{em} = 530$ нм при возбуждении $\lambda_{ex} = 420$ нм. На основании полученных данных флуоресценции, рассчитывали константы комплексообразования LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 с двухцепочечной ДНК в соответствии с методом Скэтчарда, а квантовые выходы LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 и их комплексов с двухцепочечной ДНК – методом сравнения со стандартом, в качестве которого использовали комплекс хромомицина А с дцДНК с известным квантовым выходом.

3.1.3.1 Определение констант комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с ДНК.

На рисунке 5 представлены спектры флуоресценции антибиотика LСТА-254 при добавлении увеличивающихся концентраций ДНК (от 0 до $8,3 \times 10^{-4}$ М п.о.). При последовательном увеличении концентрации дцДНК в растворе наблюдается постепенное увеличение интенсивности флуоресценции LСТА-254 ($\lambda=534$ нм и $\lambda=490$ нм), свидетельствующее об увеличении концентрации комплекса LСТА-254 с дцДНК.

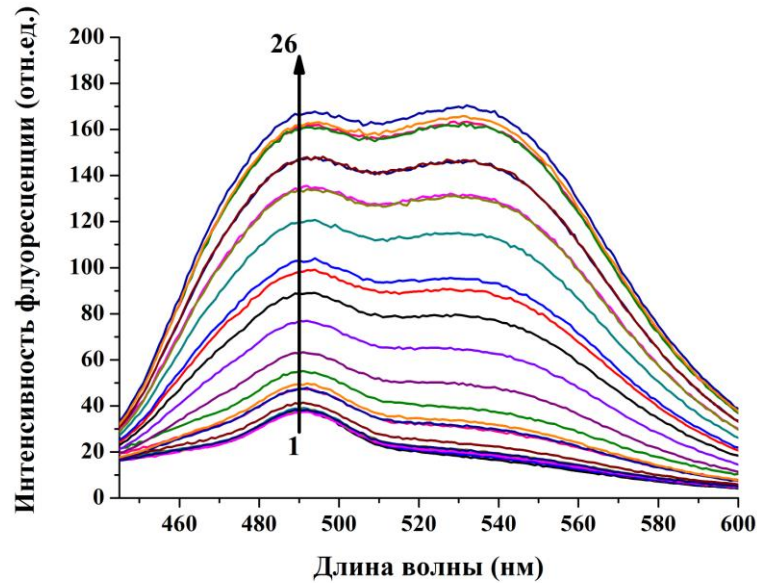


Рисунок 5. Спектры флуоресценции LSTA-254 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСl буферном растворе (рН=7,5) в присутствии $MgCl_2$ с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – 1×10^{-8} ; 3 – 2×10^{-8} ; 4 – 4×10^{-8} ; 5 – 6×10^{-8} ; 6 – 8×10^{-8} ; 7 – 1×10^{-7} ; 8 – 2×10^{-7} ; 9 – 4×10^{-7} ; 10 – 6×10^{-7} ; 11 – 8×10^{-7} ; 12 – 1×10^{-6} ; 13 – 2×10^{-6} ; 14 – 4×10^{-6} ; 15 – 6×10^{-6} ; 16 – 8×10^{-6} ; 17 – 1×10^{-5} ; 18 – 2×10^{-5} ; 19 – 4×10^{-5} ; 20 – 6×10^{-5} ; 21 – 8×10^{-5} ; 22 – 1×10^{-4} ; 23 – 2×10^{-4} ; 24 – 4×10^{-4} ; 25 – $8,3 \times 10^{-4}$ М п.о.

Интенсивность флуоресценции LSTA-254 достигает максимума при концентрации дцДНК равной 2×10^{-4} М п.о., и при дальнейшем увеличении концентрации ДНК интенсивность флуоресценции остается неизменной, так как весь имеющийся антибиотик присутствует в растворе в виде комплекса с ДНК (рисунок 6).

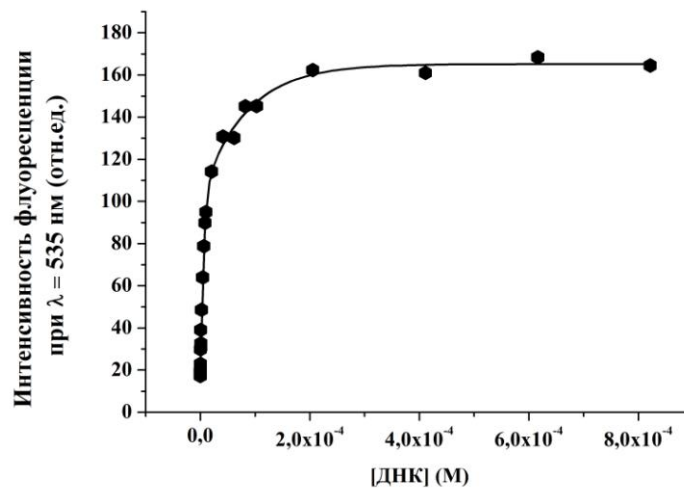


Рисунок 6. Зависимость интенсивности флуоресценции при 535 нм для LSTA-254 (1×10^{-7} М) от концентрации дцДНК.

На рисунках 7, 8, 9 и 10 представлены спектры флуоресценции LСТА-1721, LСТА-255, LСТА-1840 и LСТА-1839 при добавлении увеличивающихся концентраций ДНК, соответственно. Наблюдается увеличение интенсивности полос ($\lambda \sim 490$ нм и $\lambda \sim 535$ нм) в спектре флуоресценции по мере добавления ДНК к растворам антибиотиков, что можно проследить по рисункам 7, 8, 9 и 10.

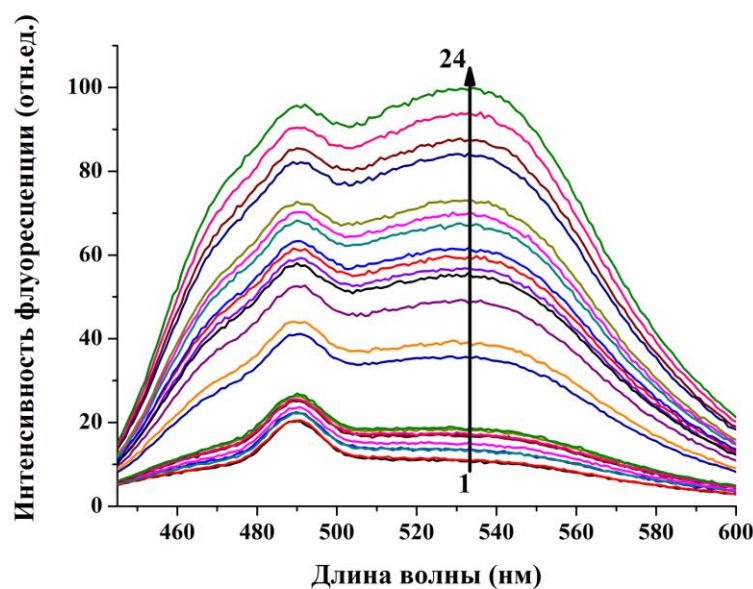


Рисунок 7. Спектры флуоресценции LСТА-1721 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии $MgCl_2$ с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – $4,8 \times 10^{-7}$; 3 – $6,85 \times 10^{-7}$; 4 – $1,37 \times 10^{-6}$; 5 – $2,74 \times 10^{-6}$; 6 – $4,11 \times 10^{-6}$; 7 – $5,48 \times 10^{-6}$; 8 – $6,85 \times 10^{-6}$; 9 – $8,22 \times 10^{-6}$; 10 – 1×10^{-5} ; 11 – $2,05 \times 10^{-5}$; 12 – $3,43 \times 10^{-5}$; 13 – $4,11 \times 10^{-5}$; 14 – $5,48 \times 10^{-5}$; 15 – $6,16 \times 10^{-5}$; 16 – $6,85 \times 10^{-5}$; 17 – $7,53 \times 10^{-5}$; 18 – $8,22 \times 10^{-5}$; 19 – $9,25 \times 10^{-5}$; 20 – $1,03 \times 10^{-4}$; 21 – $1,54 \times 10^{-4}$; 22 – $2,06 \times 10^{-4}$; 23 – $2,74 \times 10^{-4}$; 24 – $3,43 \times 10^{-4}$ М п.о.

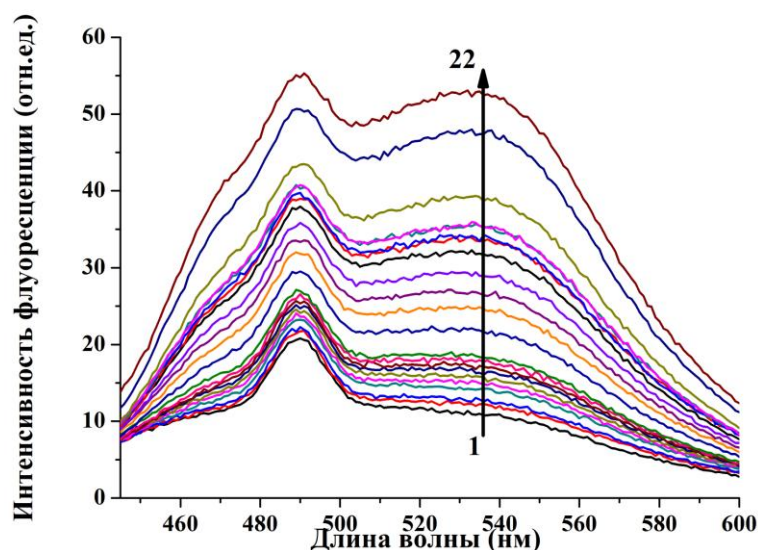


Рисунок 8. Спектры флуоресценции LSTA-255 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии $MgCl_2$ с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – $4,8 \times 10^{-6}$; 3 – $6,85 \times 10^{-6}$; 4 – $1,37 \times 10^{-5}$; 5 – $2,74 \times 10^{-5}$; 6 – $4,11 \times 10^{-5}$; 7 – $5,48 \times 10^{-5}$; 8 – $6,85 \times 10^{-5}$; 9 – $8,22 \times 10^{-5}$; 10 – $1,03 \times 10^{-4}$; 11 – $2,06 \times 10^{-4}$; 12 – $3,43 \times 10^{-4}$; 13 – $4,11 \times 10^{-4}$; 14 – $5,48 \times 10^{-4}$; 15 – $6,16 \times 10^{-4}$; 16 – $6,85 \times 10^{-4}$; 17 – $7,53 \times 10^{-4}$; 18 – $8,22 \times 10^{-4}$; 19 – $9,25 \times 10^{-4}$; 20 – $1,03 \times 10^{-3}$; 21 – $1,54 \times 10^{-3}$; 22 – $2,06 \times 10^{-3}$ М п.о.

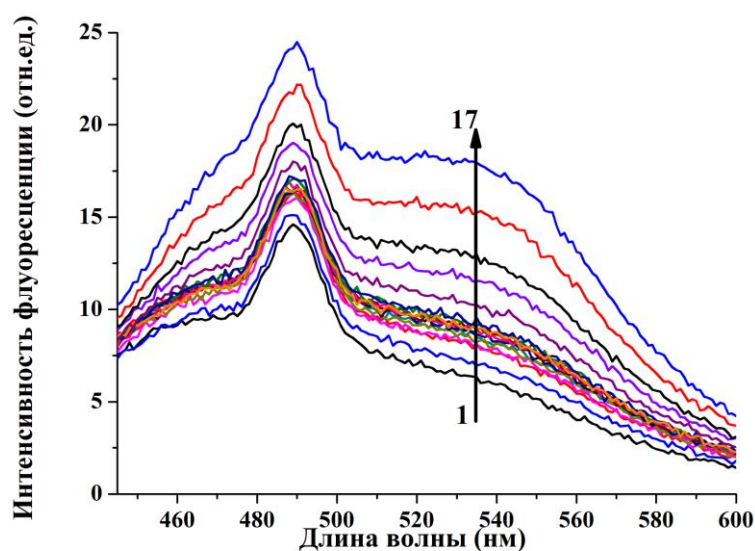


Рисунок 9. Спектры флуоресценции LSTA-1840 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии $MgCl_2$ с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – $1,03 \times 10^{-4}$; 3 – $2,06 \times 10^{-4}$; 4 – $3,43 \times 10^{-4}$; 5 – $4,11 \times 10^{-4}$; 6 – $5,48 \times 10^{-4}$; 7 – $6,16 \times 10^{-4}$; 8 – $6,85 \times 10^{-4}$; 9 – $7,53 \times 10^{-4}$; 10 – $8,22 \times 10^{-4}$; 11 – $9,25 \times 10^{-4}$; 12 – $1,03 \times 10^{-3}$; 13 – $1,54 \times 10^{-3}$; 14 – $2,06 \times 10^{-3}$; 15 – $2,74 \times 10^{-3}$; 16 – $3,43 \times 10^{-3}$; 17 – $4,11 \times 10^{-3}$ М п.о.

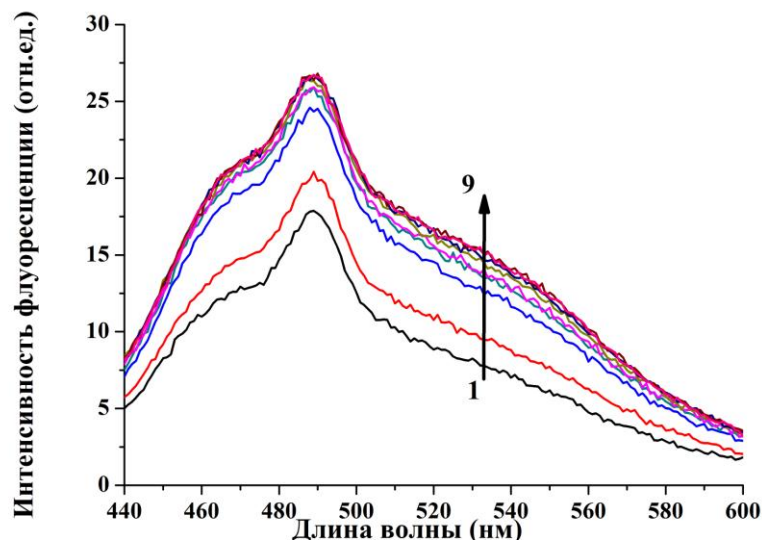


Рисунок 10. Спектры флуоресценции LСТА-1839 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСІ буферном растворе (рН~7,5) в присутствии MgCl_2 с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – $1,03 \times 10^{-3}$; 3 – $1,55 \times 10^{-3}$; 4 – $2,07 \times 10^{-3}$; 5 – $2,76 \times 10^{-3}$; 6 – $3,45 \times 10^{-3}$; 7 – $4,16 \times 10^{-3}$; 8 – $4,83 \times 10^{-3}$; 9 – $5,53 \times 10^{-3}$ М п.о.

Увеличение флуоресценции свидетельствует об образовании комплекса ДНК-лиганд. При последовательном возрастании концентрации дцДНК наблюдается постепенное увеличение интенсивности флуоресценции, обусловленное увеличением концентрации комплекса. Для LСТА-1721 и LСТА-255 интенсивность флуоресценции достигает максимума при концентрации дцДНК равной 3×10^{-4} М и 2×10^{-3} М п.о., соответственно, и при дальнейшем увеличении концентрации ДНК интенсивность флуоресценции остается неизменной, так как весь имеющийся антибиотик присутствует в растворе в виде комплекса с ДНК (рисунки 11 и 12).

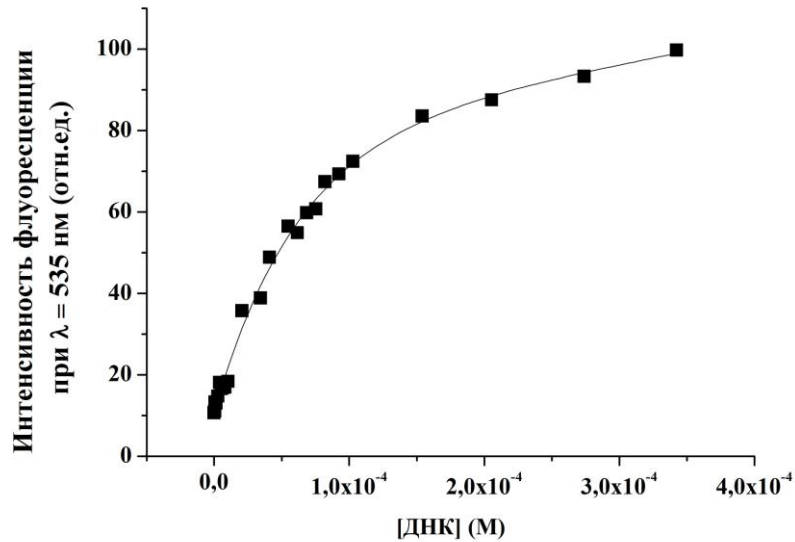


Рисунок 11. Зависимость интенсивности флуоресценции при 535 нм для LСТА-1721 (1×10^{-7} М) от концентрации дцДНК.

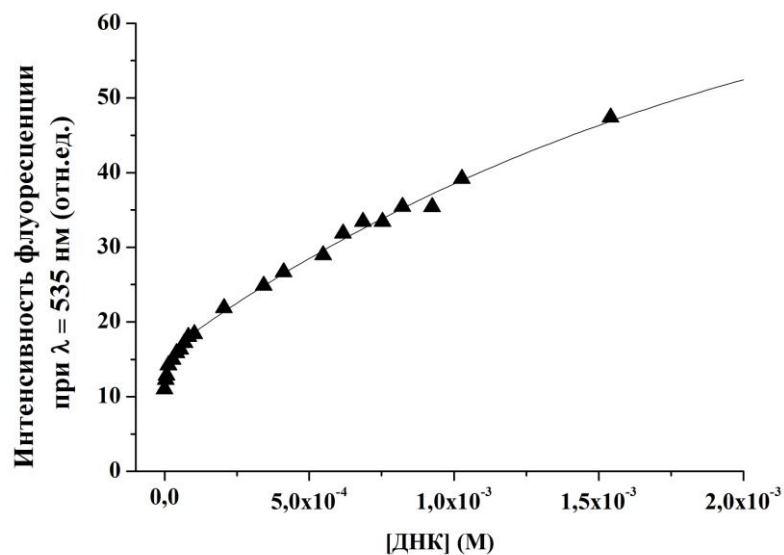


Рисунок 12. Зависимость интенсивности флуоресценции при 535 нм для LСТА-255 (1×10^{-7} М) от концентрации дцДНК.

Константу связывания LСТА-254, LСТА-255, LСТА-1721 с ДНК определяли по изменению интенсивности флуоресценции (при $\lambda=535$ нм) при добавлении постепенно увеличивающихся концентраций ДНК в координатах Скэтчарда (уравнение 2 в главе «Материалы и методы исследования», рисунки 13 и 14).

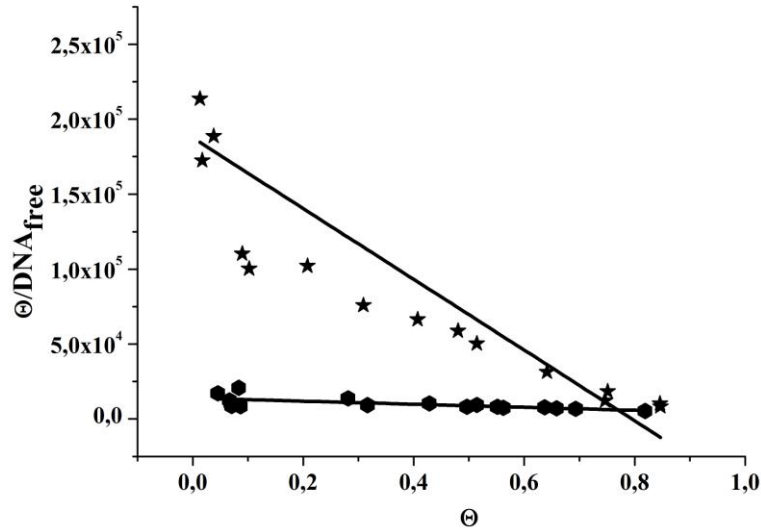


Рисунок 13. График Скэтчарда для LСТА-254 (звезды) и LСТА-1721 (шестиугольники) и дцДНК.

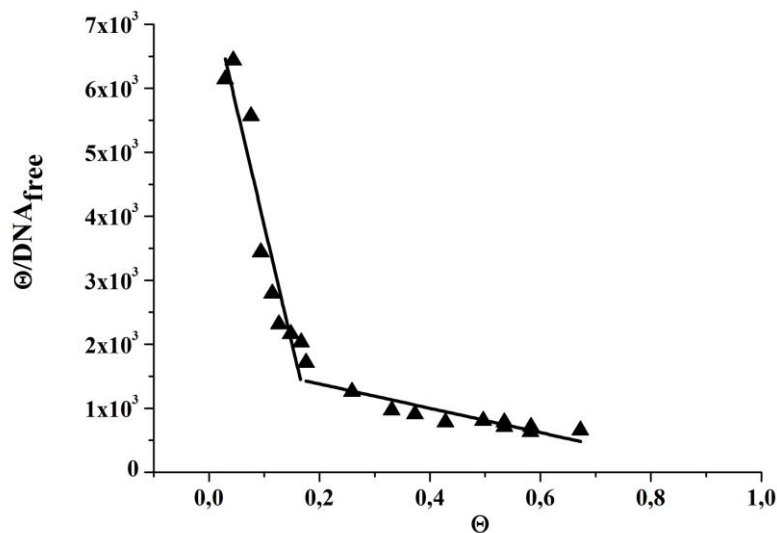


Рисунок 14. График Скэтчарда для LСТА-255 и дцДНК.

В силу слабого взаимодействия LСТА-1840 и LСТА-1839 с ДНК интенсивность флуоресценции изменяется линейно с увеличением концентрации ДНК, не достигая насыщения даже при достаточно высоких концентрациях ДНК ($4,1 \times 10^{-3}$ М и 6×10^{-3} М п.о., соответственно), то есть антибиотики присутствуют в растворе как в виде комплекса с ДНК, так и в свободном состоянии (рисунки 15 и 16).

Из-за отсутствия характерной кривой насыщения, полученной для других антибиотиков, точно определить константу связывания LСТА-1840 и LСТА-1839

с ДНК не представляется возможным. Оценочное значение константы комплексообразования для ЛСТА-1840 и ДНК составляет $K_a \leq 2,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, а для ЛСТА-1839 и ДНК – $K_a \leq 1,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

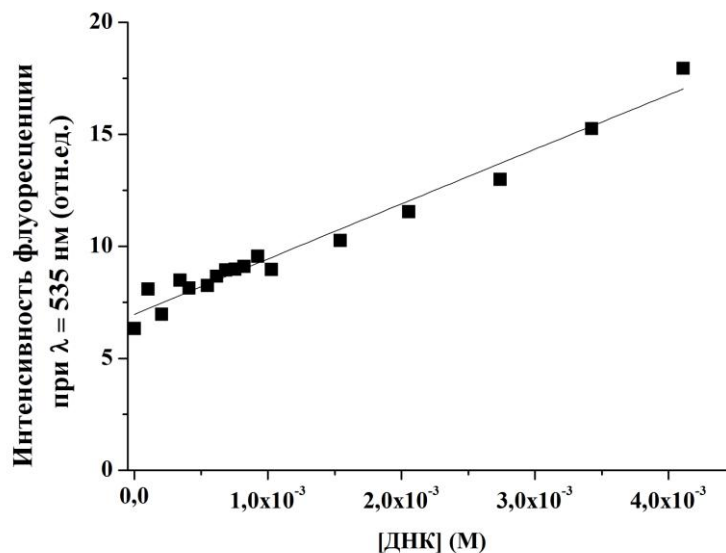


Рисунок 15. Зависимость интенсивности флуоресценции при 535 нм для ЛСТА-1840 ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) от концентрации дцДНК.

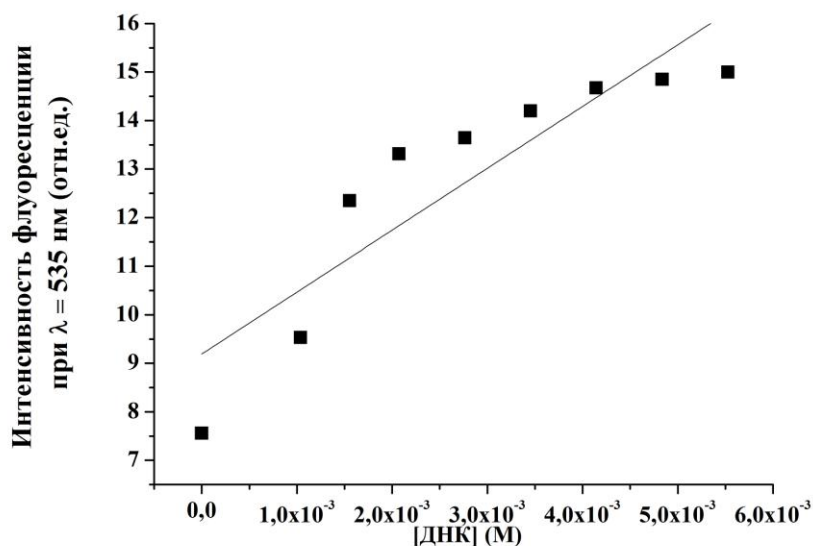


Рисунок 16. Зависимость интенсивности флуоресценции при 535 нм для ЛСТА-1839 ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) от концентрации дцДНК.

Полученные константы комплексообразования для всех исследованных в этом разделе соединений с ДНК сведены в таблице 1.

Таблица 1. Константы комплексообразования аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы с дцДНК, определенные по методу Скэтчарда.

Соединение	K_a (M^{-1})
LCTA-254	$2,4 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$
LCTA-255	$4 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3, 1 \times 10^3 \pm 3 \times 10^2$
LCTA-1721	$1 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$
LCTA-1840	$\leq 2,5 \times 10^2$
LCTA-1839	$\leq 1,5 \times 10^2$

3.1.3.2. Определение квантовых выходов флуоресценции аналогов оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомиказы и их комплексов с ДНК.

В таблице 2 представлены данные по квантовым выходам флуоресценции лигандов в буферных растворах ($\Phi_{\text{лиг}}$) и в комплексе с ДНК ($\Phi_{\text{компл}}$). Квантовые выходы флуоресценции лигандов в комплексах с ДНК $\Phi_{\text{компл}}$ определяли при высоких концентрациях ДНК, т. е. в условиях, когда в буферных растворах лиганды присутствовали только в виде комплексов с ДНК. Для расчета значений квантовых выходов флуоресценции использовали метод сравнения со стандартом, согласно уравнению 1, приведенному в главе «Материалы и методы исследования».

Таблица 2. Квантовые выходы флуоресценции производных оливомицина А с различными ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомикозы в 10 мМ трис-НСI буферном растворе в присутствии 50 мМ MgCl₂ и в комплексе с дцДНК.

Соединение	$\Phi_{\text{лиг}} (\%)$	$\Phi_{\text{компл}} (\%)$
LСТА-254	0,18	2,5
LСТА-255	0,12	1,8
LСТА-1721	0,15	2,3
LСТА-1840	0,1	1,17
LСТА-1839	0,07	0,3

Данные, представленные в таблицах 1 и 2, свидетельствуют о том, что ацильные заместители в составе А-олиозы и Е-оливомикозы сильно влияют на квантовые выходы флуоресценции LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 и их комплексов с ДНК и константы комплексообразования этих лигандов с ДНК. Так, константа комплексообразования для LСТА-254 примерно в 5 раз выше, чем для LСТА-255 и в 20 раз выше по сравнению с LСТА-1721, а квантовые выходы флуоресценции лигандов в буферных растворах и в комплексах с ДНК изменяются в широких пределах: от 0,07 до 2,5 %. Данные, представленные во второй и третьей колонках таблицы 2, свидетельствуют о том, что заместители в составе А- олиозы и Е-оливомикозы в разной степени влияют на квантовые выходы флуоресценции лигандов в буферных растворах и в комплексах с ДНК. Это может быть обусловлено тем, что микроокружение молекул лигандов в буферных растворах и в комплексе с ДНК существенно отличается из-за специфических взаимодействий молекул лигандов с ДНК, что должно влиять на квантовые выходы флуоресценции. Действительно, в таблице 2 показано, что квантовые выходы флуоресценции, например для LСТА-254 и LСТА-255 в комплексе с ДНК, возрастают, соответственно, в 13,7 и 14,4 раз. В других работах было показано, что лиганды в комплексах с ДНК расположены вдоль малых бороздок молекул ДНК. Ранее методом ЯМР и рентгеноструктурным анализом для производных ауреоловой кислоты было показано, что в результате

взаимодействия сахаридных остатков антибиотиков с ДНК в малой бороздке внутримолекулярные вращения в молекулах лигандов затрудняются. Это приводит к замедлению безызлучательных процессов и, соответственно – возрастанию квантовых выходов флуоресценции лигандов в комплексах с ДНК по сравнению с квантовыми выходами лигандов в буферном растворе. Однако внутримолекулярные вращения в лигандах, локализованных в малых бороздках ДНК затрудняются не полностью, а частично, т. к. в комплексах с ДНК сохраняется влияние заместителей на квантовые выходы флуоресценции. Если бы внутримолекулярные вращения в комплексе с ДНК полностью «замораживались», то не наблюдалось бы влияния заместителей в сахаридных остатках лигандов на квантовые выходы флуоресценции, а их значения для всех лигандов были бы примерно одинаковы. Другие заместители в ди- и трисахаридных цепях лигандов, возможно, также могут оказывать влияние на взаимодействие этих лигандов с молекулой ДНК в малой бороздке. Как было показано в других работах, дисахаридные заместители взаимодействуют в основном с сахарофосфатным остовом (СФО) ДНК, трисахаридные заместители располагаются внутри малой бороздки ДНК, и ОН-группы агликонового остатка обуславливают специфичное взаимодействие с GC парами оснований ДНК [4, 81]. При наличии сложноэфирных заместителей в R_2 , как, например, в LСТА-254, могут образовываться водородные связи между А-олиозой одной молекулы магниевого комплекса лигандов с D-оливозой другой молекулы. Образование такой водородной связи между молекулами лигандов делает молекулу комплекса более компактной, обладающей более жесткой молекулярной структурой, в которой понижена подвижность заместителей. Поэтому квантовые выходы этих соединений должны быть выше, чем для соединений, содержащих ОН-группу, как, например, в LСТА-255, в которых такая внутримолекулярная водородная связь не образуется, и структура LСТА-255 представляется более «рыхлой» по сравнению с LСТА-254. Действительно, возможно в силу этой причины, LСТА-254 обладает более высокими квантовыми выходами флуоресценции как в комплексе с ДНК, так и в свободном состоянии в буфере, по сравнению с LСТА-

255. Все исследованные молекулы лигандов имеют одинаковые заместители в В-оливомозе дисахаридного заместителя, поэтому все исследованные молекулы, по видимому, одинаково взаимодействуют с СФО.

Структуры соединений LCTA-254, LCTA-255 различаются только заместителями дисахаридной ветви, структура же трисахаридных заместителей для этих соединений полностью идентична. Трисахаридные заместители обуславливают взаимодействие оливомицинов А с малой бороздкой двухцепочечной ДНК. Поэтому представлялось важным исследование влияния структуры трисахаридных заместителей на константы связывания LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840 с дцДНК. С этой целью были изучены такие соединения, как LCTA-1721, имеющее ацетильный заместитель в положении R₁, LCTA-1839, содержащее гидроксильные заместители в положениях R₁ и R₂, и LCTA-1840 с гидроксильным заместителем R₁.

В таблице 1 представлены значения констант комплексообразования соединений LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840 с дцДНК. Для LCTA-1721 наблюдается значение константы комплексообразования, сопоставимое со значением константы для LCTA-255. Оценочное значение константы связывания для LCTA-1840 и LCTA-1839 почти на 3 порядка меньше, чем для LCTA-254, и почти на 2 порядка меньше, чем для LCTA-255 и LCTA-1721. Для LCTA-1839 наблюдалось увеличение интенсивности в спектрах флуоресценции при повышении концентрации дцДНК от 0 до $5,6 \times 10^{-3}$ М п.о. менее чем в 2 раза, тогда как для других соединений эта величина была значительно больше, поэтому вычислить константу связывания для LCTA-1839 не представлялось возможным. Согласно оценке, значение константы связывания для LCTA-1839 не может превышать $1,5 \times 10^2$ М⁻¹. В таблице 2 представлены значения квантовых выходов флуоресценции для соединений LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840. Для LCTA-1721 значения квантовых выходов приближены к LCTA-254, в отличие от LCTA-1840 и LCTA-1839, имеющих значительно более низкие значения. Структура LCTA-1721 отличается от структуры LCTA-254 наличием ацетильного заместителя R₁ вместо изобутирильного в трисахаридном фрагменте. Как видно

из сравнения LCTA-254 и LCTA-1721, замена изобутирильного заместителя на ацетильный влечет за собой снижение K_a и Φ_{fl} , что, возможно, связано с изменением гидрофобного вклада при комплексообразовании лигандов, а именно с большей гидрофобностью изобутирильного остатка в оливомицине А LCTA-254 по сравнению с ацетильным в LCTA-1721. Переход от ацетильной группы к гидроксильной в этом же положении при сопоставлении LCTA-1721 и LCTA-1839 и LCTA-1840 вызывает значительное уменьшение, как константы комплексообразования, так и квантовых выходов флуоресценции в комплексах с ДНК, связанное с еще большим снижением гидрофобности.

Таким образом, было показано, что соединения с двумя ацильными заместителями в сахаридных цепях, такие как LCTA-254 и LCTA-1721, характеризуются наибольшими в ряду соединений константами комплексообразования с ДНК ($\sim 2,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $\sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, соответственно), квантовыми выходами флуоресценции $\Phi_{лиг}$ и $\Phi_{компл}$, а также амплитудами индуцированного КД в комплексе с ДНК. Замена ацетильного заместителя в составе А-олиозы на гидроксильный, как в LCTA-255, приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции, как лиганда, так и его комплекса с ДНК, а также амплитуды индуцированного КД в присутствии ДНК. В то же время де-О-ацилирование изобутирильного остатка в составе Е-оливомикозы (LCTA-1840), как и полное деацилирование в составе А-олиозы и Е-оливомикозы (LCTA-1839), полностью нарушает комплексообразование этих лигандов с ДНК ($K_a \leq 2,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ и $K_a \leq 1,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, соответственно), а также приводит к существенному уменьшению квантовых выходов флуоресценции $\Phi_{лиг}$ и $\Phi_{компл}$ и амплитуд индуцированного КД в комплексе с ДНК.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных был сделан вывод о том, что, изменяя заместители в дисахаридной и трисахаридной ветвях антибиотика, можно варьировать физико-химические свойства соединений в очень широких пределах [82].

3.2 Физико-химические свойства производных оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона и их комплексов с ДНК.

3.2.1 Спектрофлуориметрическое исследование комплексообразования производных оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с ДНК.

3.2.1.1 Определение констант комплексообразования производных оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с ДНК

На рисунках 17 и 18 представлены спектры флуоресценции антибиотиков LСТА-1599 и LСТА-1498 в присутствии увеличивающихся концентраций ДНК. Увеличение интенсивности полос ($\lambda \sim 535$ нм и $\lambda \sim 490$ нм) в спектрах флуоресценции свидетельствует об образовании комплексов антибиотиков с дцДНК, как это было отмечено ранее для других аналогов оливомицина А.

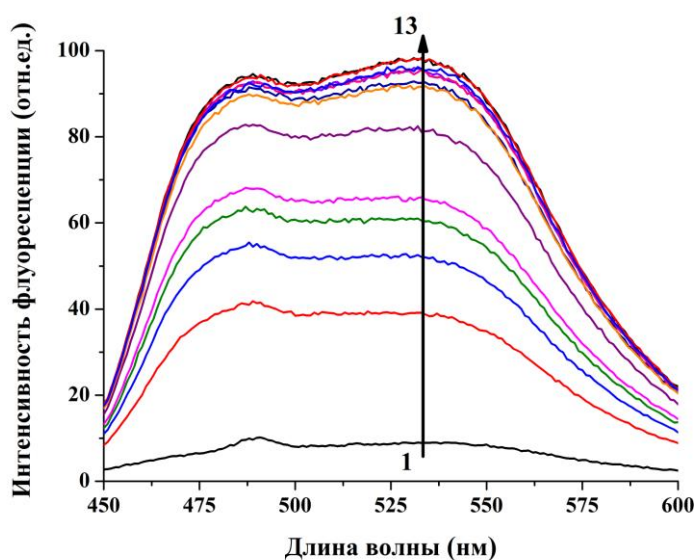


Рисунок 17. Спектры флуоресценции LСТА-1599 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии хлорида магния с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – $3,16 \times 10^{-6}$; 3 – $4,74 \times 10^{-6}$; 4 – $6,32 \times 10^{-6}$; 5 – $7,9 \times 10^{-6}$; 6 – $1,58 \times 10^{-5}$; 7 – $3,16 \times 10^{-6}$; 8 – $4,74 \times 10^{-5}$; 9 – $6,32 \times 10^{-5}$; 10 – $8,8 \times 10^{-5}$; 11 – $1,75 \times 10^{-4}$; 12 – $3,5 \times 10^{-4}$; 13 – $5,26 \times 10^{-4}$ М п.о.

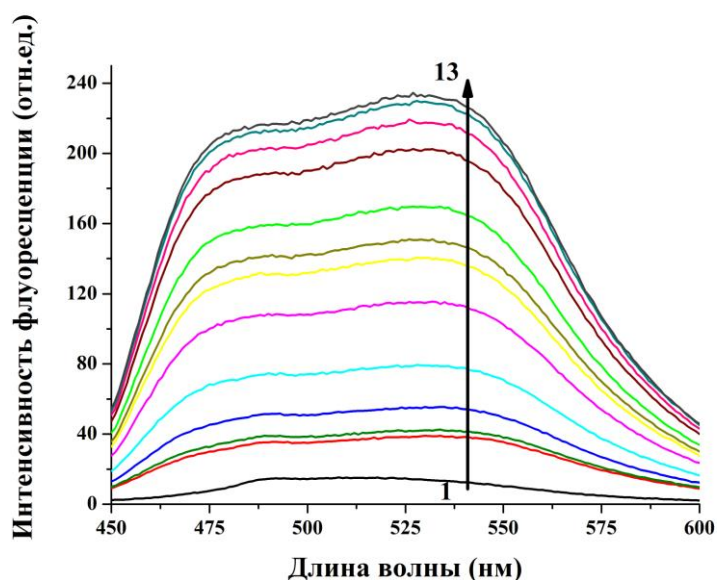


Рисунок 18. Спектры флуоресценции LСТА-1498 (1×10^{-7} М) в 10 мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии хлорида магния с концентрацией 5×10^{-2} М при добавлении увеличивающихся концентраций дцДНК: 1 – 0; 2 – 6×10^{-6} ; 3 – 7×10^{-6} ; 4 – 1×10^{-5} ; 5 – $2,1 \times 10^{-5}$; 6 – $3,9 \times 10^{-5}$; 7 – 6×10^{-5} ; 8 – 7×10^{-5} ; 9 – 1×10^{-4} ; 10 – $2,1 \times 10^{-4}$; 11 – $3,9 \times 10^{-4}$; 12 – 6×10^{-4} ; 13 – 7×10^{-4} М п.о.

Как можно видеть из рисунков 19 и 20, интенсивность флуоресценции перестает изменяться при достижении концентрации дцДНК 3×10^{-5} М п.о. для LСТА-1599 и 2×10^{-4} М п.о. для LСТА-1498, что говорит о полном связывании антибиотиков с ДНК.

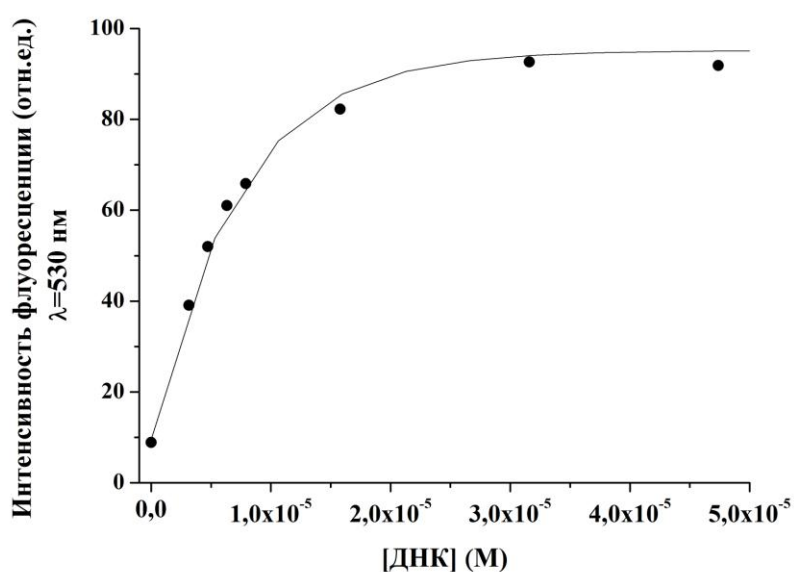


Рисунок 19. Зависимость интенсивности флуоресценции при 530 нм для LСТА-1599 (1×10^{-7} М) от концентрации дцДНК.

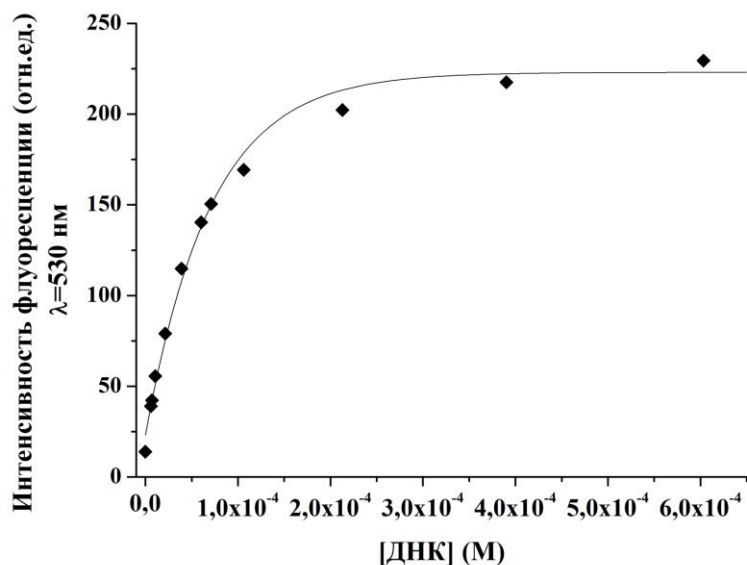


Рисунок 20. Зависимость интенсивности флуоресценции LСТА-1498 (1×10^{-7} М) при 530 нм от концентрации дцДНК.

Исходя из полученных зависимостей интенсивности флуоресценции (при $\lambda=530$ нм) от концентрации дцДНК определяли константы комплексообразования, K_a , LСТА-1498 и LСТА-1599 с дцДНК по методу Скэтчарда (рисунок 21). Полученные значения приведены в таблице 3.

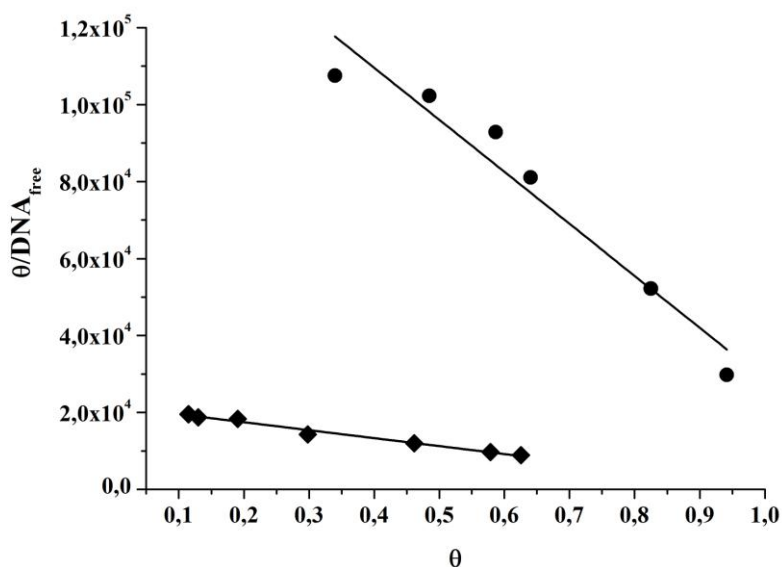


Рисунок 21. График Скэтчарда для LСТА-1498 (ромб) и LСТА-1599 (круг) и дцДНК.

Таблица 3. Константы комплексообразования аналогов оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с дцДНК, определенные по методу Скэтчарда.

Соединение	K_a (M ⁻¹)
LCTA-1599	$1,35 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$
LCTA-1498	$2,1 \times 10^4 \pm 1,24 \times 10^3$

3.2.1.2 Определение квантовых выходов флуоресценции комплексов аналогов оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с ДНК.

Квантовые выходы флуоресценции комплексов LCTA-1599 и LCTA-1498 с ДНК определяли методом сравнения со стандартом, аналогично LCTA-254, согласно уравнению 1, приведенному в главе «Материалы и методы исследования». Полученные данные сведены в таблицу 4.

Таблица 4. Квантовые выходы флуоресценции аналогов оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона и их комплексов с дцДНК.

Соединение	$\Phi_{\text{компл}}$ (%)
LCTA-1599	2,0
LCTA-1498	1,9

Как можно видеть, соединения LCTA-1498 и LCTA-1599 отличаются друг от друга наличием карбоксильной и N,N-диметиламиноэтиламидной групп, соответственно. Исходя из данных таблицы 3, можно сделать вывод о том, что амидная группа облегчает встраивание лиганда в малую бороздку ДНК. Действительно, наличие N,N-диметиламиноэтиламидной группы увеличивает сродство LCTA-1599 к ДНК в 6,4 раза по сравнению с LCTA-1498. По всей видимости, при нейтральном рН отрицательно заряженная карбоксильная группа может затруднять взаимодействие антибиотика с ДНК. Логично предположить, что отрицательно заряженная карбоксильная группа будет негативным образом

сказываться на взаимодействии молекулы лиганда с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК, как одним из первых этапов комплексообразования. Важно отметить, что нивелирование отрицательно заряженной группы LСТА-1498 при переходе к амидной группе LСТА-1599 также приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции в комплексе с ДНК (таблица 4). В отсутствие электростатического барьера к сахарофосфатному остову у LСТА-1599, лиганд, по-видимому, более прочно закрепляется в малой бороздке ДНК, что уменьшает количество степеней свободы молекулы антибиотика. Это приводит к замедлению безызлучательных процессов, а впоследствии к увеличению квантового выхода флуоресценции в комплексе с ДНК, а также к более высокой константе комплексообразования. Немаловажным является тот факт, что LСТА-1599 за счет амидной группы представляет собой более гидрофобную молекулу, по сравнению с LСТА-1498. Более гидрофобная молекула LСТА-1599 прочнее взаимодействует с ДНК, что подтверждает доминирующую энтропийную природу данного взаимодействия. Потеря гидрофобности при переходе от амидной группы к карбоксильной драматическим образом сказывается на константе взаимодействия, уменьшая ее в 6,4 раза.

При сравнении соединений LСТА-1599 и LСТА-1498 с LСТА-254 можно отметить, что константы комплексообразования первого и последнего соединений в ряду отличаются менее чем в 2 раза, в то время как для LСТА-1498 и LСТА-254 разница составляет порядок величины. Несмотря на более гидрофобную амидную группу LСТА-1599, константа этого антибиотика с ДНК в 2 раза меньше по сравнению с константой для LСТА-254. По-видимому, важную роль при комплексообразовании играет стерический фактор, так как объемный N,N-диметиламиноэтиламидный заместитель затрудняет взаимодействие LСТА-1599 с малой бороздкой ДНК. Наличие отрицательно заряженной карбоксильной группы в LСТА-1498 и вовсе приводит к уменьшению константы взаимодействия с ДНК в 10 раз по сравнению с LСТА-254.

Из вышесказанного можно заключить, что заместители в C₃-положении играют важную роль в комплексообразовании с ДНК, а также влияют на

квантовый выход флуоресценции лигандов в комплексе с ДНК. Замена vicинальных гидроксиллов LСТА-254 на карбоксильную группу в LСТА-1498 приводит к уменьшению константы комплексообразования антибиотика с ДНК в 10 раз, в то время как ее амидирование с получением N,N-диметиламиноэтиламидной группы обуславливает рост константы в 6,4 раза [53].

3.3 Спектрально-кинетические характеристики комплексов оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2.

3.3.1 Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом спектрофотометрии.

При добавлении олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 к раствору, содержащему антибиотик оливомицин А (LСТА-254), наблюдалось уширение спектра лиганда, а также батохромный сдвиг максимума спектра, что свидетельствует о комплексообразовании LСТА-254 с олигонуклеотидами (рисунки 22, 23 и 24). Помимо этого наблюдалось увеличение поглощения в длинноволновой области спектра при 440 нм. При анализе спектров поглощения комплексообразования LСТА-254 со всеми тремя олигонуклеотидами (Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2) была обнаружена изобестическая точка (~427 нм, ~427 нм, ~ 438 нм, соответственно), что может свидетельствовать об образовании одного типа комплекса и равновесия между LСТА-254 и олигонуклеотидами.

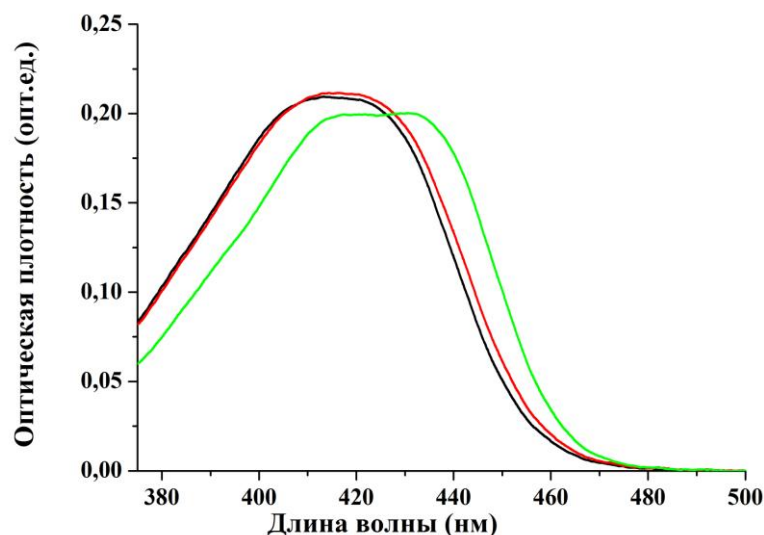


Рисунок 22. Спектры поглощения LSTA-254 (20 мкМ) в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН=7,5), 50 мМ MgCl₂, в присутствии увеличивающихся концентраций олигонуклеотида Sp1/NFAT (черный – 0 М Sp1/NFAT, красный – $2,5 \times 10^{-6}$ М Sp1/NFAT, зеленый – 2×10^{-5} М Sp1/NFAT).

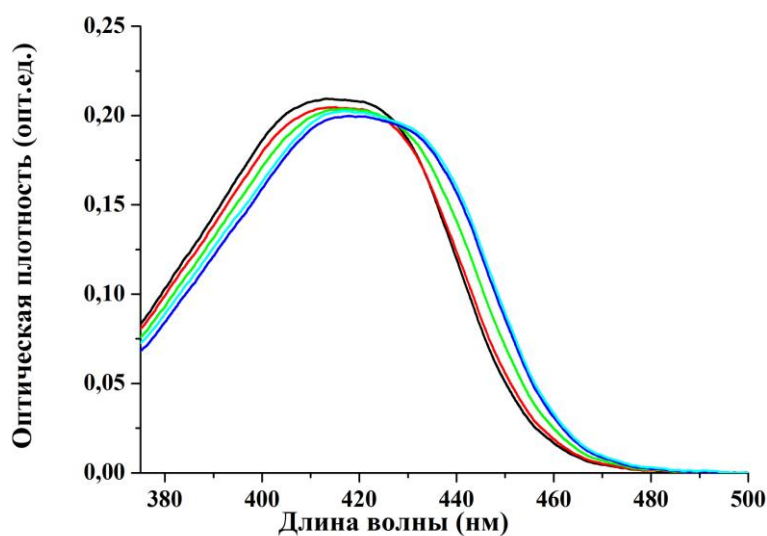


Рисунок 23. Спектры поглощения LSTA-254 (20 мкМ) в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН=7,5), 50 мМ MgCl₂, в присутствии увеличивающихся концентраций олигонуклеотида Sp1/NFAT-m1 (черный – 0 М Sp1/NFAT-m1, красный – $2,5 \times 10^{-6}$ М Sp1/NFAT-m1, зеленый – 5×10^{-6} М Sp1/NFAT-m1, голубой – 1×10^{-5} М Sp1/NFAT-m1, синий – 2×10^{-5} М Sp1/NFAT-m1).

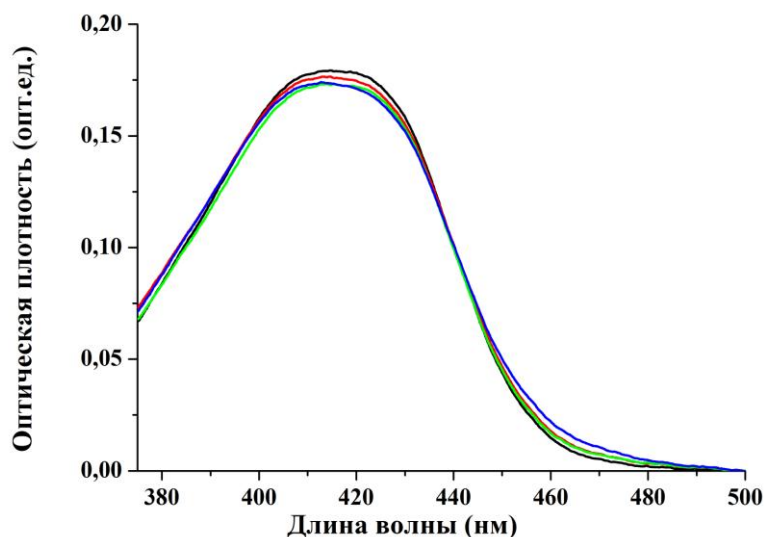


Рисунок 24. Спектры поглощения LCTA-254 (15 мкМ) в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН=7,5), 50 мМ MgCl₂, в присутствии увеличивающихся концентраций олигонуклеотида Sp1\NFAT-m2 (черный – 0 М, красный – $2,5 \times 10^{-6}$ М, зеленый – 1×10^{-5} М, синий – 2×10^{-5} М).

3.3.2. Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом кругового дихроизма.

На рисунке 25 представлены спектры КД свободного оливомицина А, а также комплексов оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2. Спектр КД в полосе поглощения LCTA-254 в присутствии олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 имеет положительный знак, а в случае дуплексов Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1 – увеличенную амплитуду сигнала, что свидетельствует о комплексообразовании с олигонуклеотидами. Поглощение в спектре индуцированного КД для комплекса LCTA-254 с олигонуклеотидом Sp1/NFAT имеет в 3,5 раза большее значение по сравнению с амплитудой сигнала свободного лиганда. В то же время значение поглощения в спектре КД комплекса LCTA-254 с Sp1/NFAT является самым высоким относительно комплексов с другими олигонуклеотидами, использованными в данном исследовании. Поглощение КД комплекса LCTA-254

с Sp1/NFAT-m1 меньше по сравнению с поглощением КД комплекса с Sp1/NFAT, но все же больше, чем для комплекса с Sp1/NFAT-m2, для которого изменения сигнала КД при комплексообразовании отсутствовали. Отсутствие изменений поглощения в спектрах КД для LCTA-254 в присутствии Sp1/NFAT-m2 свидетельствует о значительно более низкой константе комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT-m2 по сравнению с Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1. Поглощение КД комплексов LCTA-254 с олигонуклеотидами увеличивается в ряду Sp1/NFAT-m2 < Sp1/NFAT-m1 < Sp1/NFAT при одинаковых условиях измерения, что может говорить об усилении взаимодействия между лигандом и спиральной структурой олигонуклеотида [71].

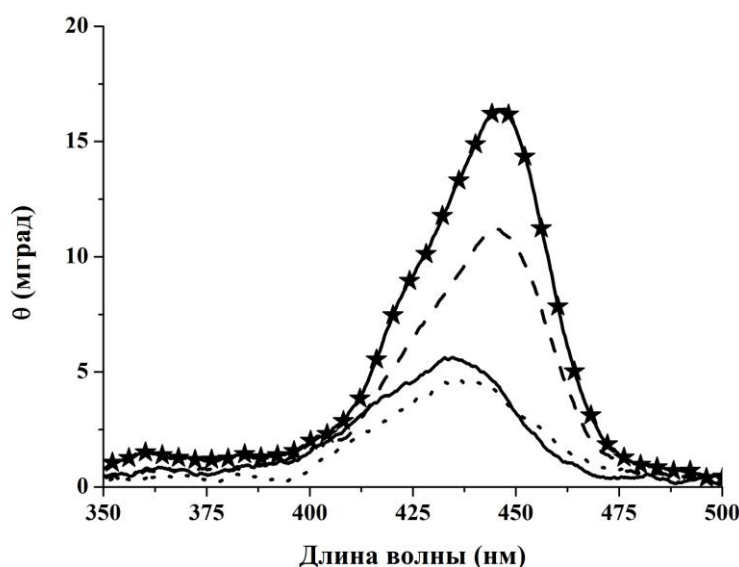


Рисунок 25. Спектры КД LCTA-254 (линия) и комплексов LCTA-254 ($[LCTA-254] = 1 \times 10^{-5}$ М) с олигонуклеотидами Sp1/NFAT ($[Sp1/NFAT] = 2 \times 10^{-5}$ М) (линия со звездами), Sp1/NFAT-m1 ($[Sp1/NFAT]-m1 = 2 \times 10^{-5}$ М) (пунктир), Sp1/NFAT-m2 ($[Sp1/NFAT]-m2 = 2 \times 10^{-5}$ М) (точки) в 10 мМ трис-НСl буфере (рН=7,5) в присутствии 50 мМ $MgCl_2$.

3.3.3. Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом спектрофлуориметрии.

Последовательное увеличение концентрации олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1 в растворе LCTA-254 приводило к увеличению интенсивности флуоресценции лиганда ($\lambda_{ex}=425$ нм; $\lambda_{em}=470$ нм и $\lambda_{em}=535$ нм) (рисунок 26). Данные по увеличению интенсивности спектров флуоресценции при добавлении олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1 свидетельствуют о комплексообразовании LCTA-254 с данными олигонуклеотидами. Увеличение интенсивности флуоресценции прекращается по достижении концентрации Sp1/NFAT 5×10^{-6} М. При комплексообразовании LCTA-254 с Sp1/NFAT-m1 насыщение достигалось при концентрации олигонуклеотида 2×10^{-5} М. Изменения интенсивности спектров флуоресценции LCTA-254 при последовательном увеличении концентрации Sp1/NFAT-m2 не наблюдалось.

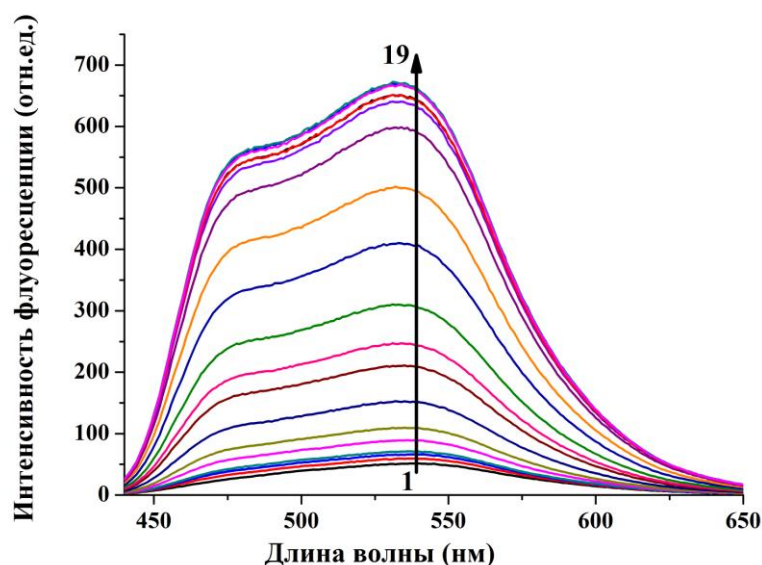


Рисунок 26. Спектры флуоресценции LCTA-254 (2 мкМ) в 10 мМ трис-НСI буферном растворе (рН=7,5) в присутствии MgCl₂ с концентрацией 5×10^{-2} М при увеличивающихся концентрациях олигонуклеотида Sp1/NFAT: 1 – 0; 2 – 4×10^{-8} ; 3 – $6,5 \times 10^{-8}$; 4 – 8×10^{-8} ; 5 – 1×10^{-7} ; 6 – 2×10^{-7} ; 7 – 4×10^{-7} ; 8 – 6×10^{-7} ; 9 – 8×10^{-7} ; 10 – 1×10^{-6} ; 11 – $1,5 \times 10^{-6}$; 12 – 2×10^{-6} ; 13 – 4×10^{-6} ; 14 – 6×10^{-6} ; 15 – 6×10^{-6} ; 16 – 8×10^{-6} ; 17 – 1×10^{-5} ; 18 – 2×10^{-5} ; 19 – 4×10^{-5} М.

3.3.3.1. Определение констант комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2

Для определения констант комплексообразования оливомицина А (LCTA-254) с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 использовали метод флуоресцентного титрования LCTA-254 при последовательном увеличении концентрации олигонуклеотидов. На рисунках 27 и 28 представлены зависимости интенсивности флуоресценции LCTA-254 от концентрации добавляемых олигонуклеотидов Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1, соответственно.

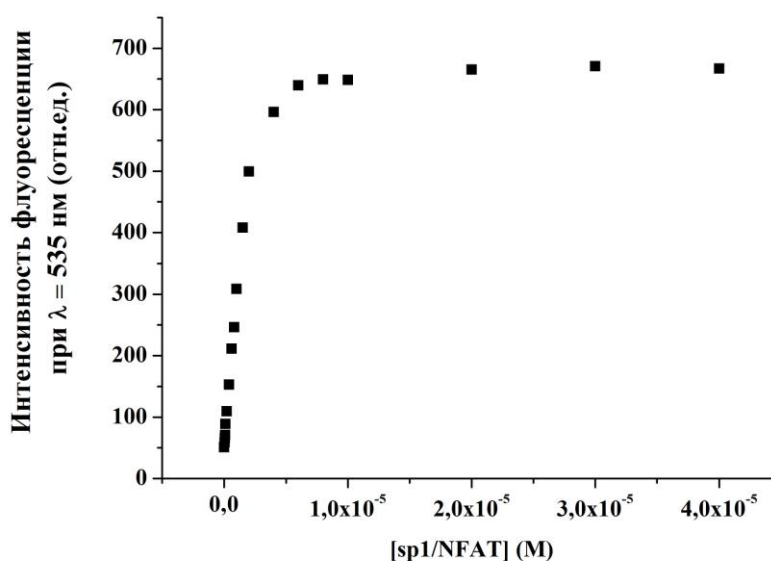


Рисунок 27. График зависимости интенсивности флуоресценции LCTA-254 (2 мкМ) ($\lambda_{em} = 535$ нм) при последовательном увеличении концентрации олигонуклеотида Sp1/NFAT в 10 мМ трис-НСl буфере с 50 мМ MgCl₂ (pH=7,3).

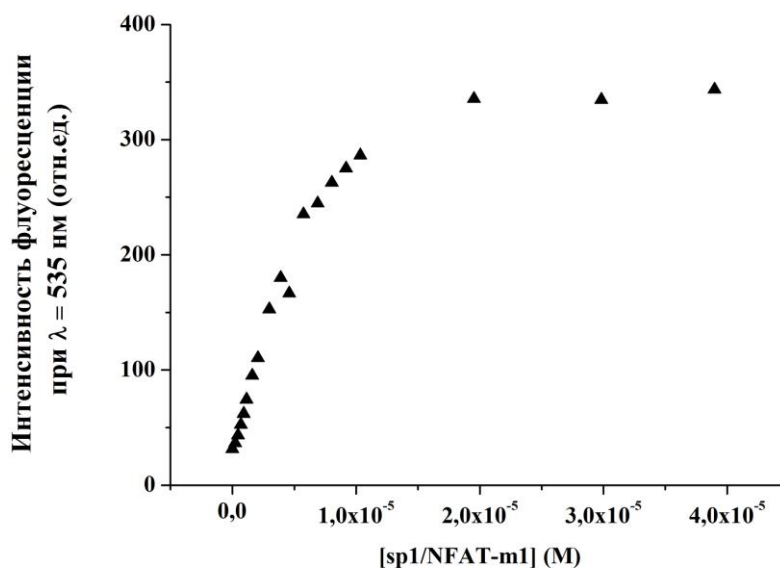


Рисунок 28. График зависимости интенсивности флуоресценции LCTA-254 (5 мкМ) ($\lambda_{em} = 535$ нм) при увеличивающихся концентрациях олигонуклеотида Sp1/NFAT-m1 в 10 мМ трис-НСl буфере с 50 мМ MgCl₂ (рН=7,5).

Исходя из кривых насыщения, были рассчитаны концентрации свободного и связанного антибиотика. Эти данные были преобразованы в соответствии с уравнением Скэтчарда (1):

$$r/C_f = K_a \times (n-r) \quad (1),$$

где $r = [LCTA-254]_b / [oligo]_t$ – соотношение концентрации связанного антибиотика ($[LCTA-254]_b$) на общую добавленную концентрацию олигонуклеотида ($[oligo]_t$), $C_f = [LCTA-254]_{free}$ – концентрация свободного (несвязанного) антибиотика, K_a – константа комплексообразования, n – стехиометрический коэффициент.

Графики Скэтчарда комплексообразования LCTA-254 с олигонуклеотидами Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1 представлены на рисунках 29 и 30. Значения констант комплексообразования LCTA-254 со всеми исследованными олигонуклеотидами приведены в таблице 5.

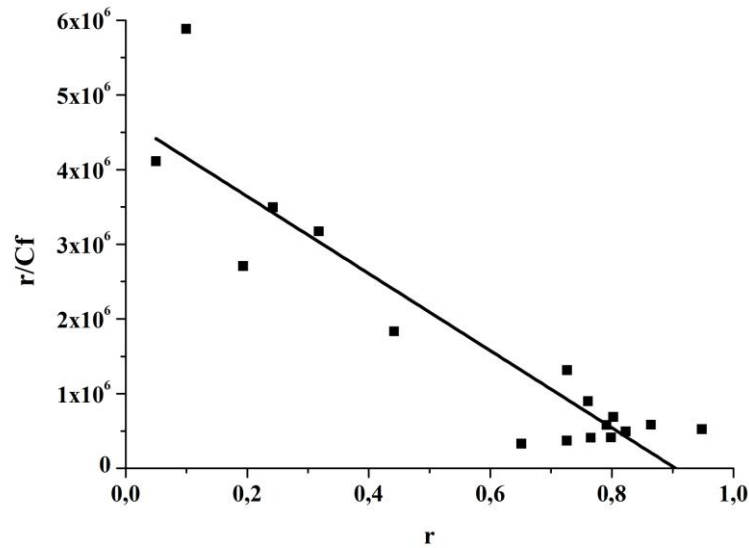


Рисунок 29. График Скэтчарда комплексообразования LCTA-254 и олигонуклеотида Sp1/NFAT.

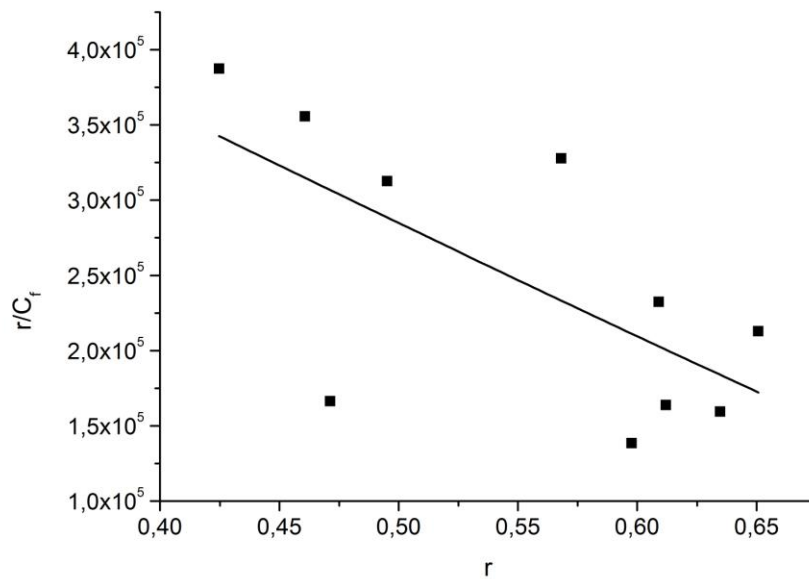


Рисунок 30. График Скэтчарда комплексообразования оливомицина А и олигонуклеотида Sp1/NFAT-m1.

Представленные графики Скэтчарда свидетельствуют о том, что комплексообразование между LCTA-254 и олигонуклеотидами Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1 происходит в стехиометрическом соотношении 1:1. Исходя из полученных данных стехиометрии, можно предположить, что в структуре олигонуклеотидов Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1 имеется только один сайт связывания для LCTA-254. В случае олигонуклеотида Sp1/NFAT-m2 и LCTA-254

не удалось определить константу комплексообразования, как и стехиометрическое соотношение, методом флуоресцентного титрования в силу слабого изменения спектров флуоресценции. Как можно видеть, исследованные олигонуклеотиды Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 отличаются друг от друга последовательностью пар оснований. Sp1/NFAT среди них является самым GC-насыщенным, в то время как Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 обладают измененной по сравнению с Sp1/NFAT последовательностью пар оснований в структуре олигонуклеотидов, а именно, заменены некоторые GC-основания на AT, что существенно повлияло на комплексообразование с LCTA-254. Так, в ряду олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 оливомицин А проявил наибольшую аффинность к Sp1/NFAT ($\sim 5,16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), что может говорить о крайне высокой специфичности антибиотика к данной последовательности дцДНК, так как константа комплексообразования оливомицина А с дцДНК спермы лосося составляла $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ [82]. Нарушение состава GC-насыщенного участка в Sp1/NFAT-m1 по сравнению с Sp1/NFAT привело к существенному снижению константы комплексообразования, которая составила $\sim 7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, что почти на порядок меньше, чем для исходного олигонуклеотида Sp1/NFAT и также подтверждает данные о высокой специфичности комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT. Дальнейшее изменение состава исходного олигонуклеотида Sp1/NFAT, как в Sp1/NFAT-m2, а именно, увеличение количества AT-оснований, замещающих GC, привело к еще более существенному снижению константы комплексообразования, которую рассчитать не удалось. По оценочным данным она может составлять $\leq 2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (таблица 5). Отсутствие комплексообразования LCTA-254 с Sp1/NFAT-m2 в исследованном диапазоне концентраций (вплоть до $4 \times 10^{-5} \text{ M}$) может быть связано с тем, что в составе этого олигонуклеотида отсутствует минимальный сайт связывания, требуемый для образования прочного комплекса антибиотика с олигонуклеотидом. Действительно, для комплексообразования хромофора производных оливомицина А требуется 3–4 GC пары оснований, расположенных подряд [83]. Данное условие

не выполняется для олигонуклеотида Sp1/NFAT-m2, который имеет в своей структуре лишь 2 GC пары оснований подряд, что, по-видимому, и обуславливает отсутствие образования прочного комплекса с этим олигонуклеотидом. Наблюдаемые изменения в спектрах поглощения LCTA-254 при добавлении увеличивающихся концентраций олигонуклеотида Sp1/NFAT-m2 могут быть результатом взаимодействия три- и дисахаридных остатков молекулы LCTA-254 с сахарофосфатным остовом или основаниями олигонуклеотида.

Таблица 5. Константы комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2.

Название олигонуклеотида	K_a (M^{-1})	n
Sp1/NFAT	$5,2 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^5$	$0,9 \pm 0,03$
Sp1/NFAT-m1	$7,5 \times 10^5 \pm 3 \times 10^5$	$0,94 \pm 0,17$
Sp1/NFAT-m2	$\leq 2,5 \times 10^4$	-

3.3.4. Исследование комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 методом остановленной струи с флуоресцентной детекцией.

Кинетику комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 регистрировали по увеличению флуоресценции LCTA-254 на длинах волн $\lambda_{em} > 450$ и длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 425$ нм в миллисекундном/секундном диапазоне. Кинетика комплексообразования антибиотика и олигонуклеотида Sp1/NFAT при концентрации 20 мкМ олигонуклеотида Sp1/NFAT приведена на рисунке 31. Кинетическая кривая комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT-m1 отражена на рисунке 32. Нетрудно увидеть, что полученные кинетические кривые хорошо описываются биэкспоненциальной моделью с быстрой и медленной компонентами.

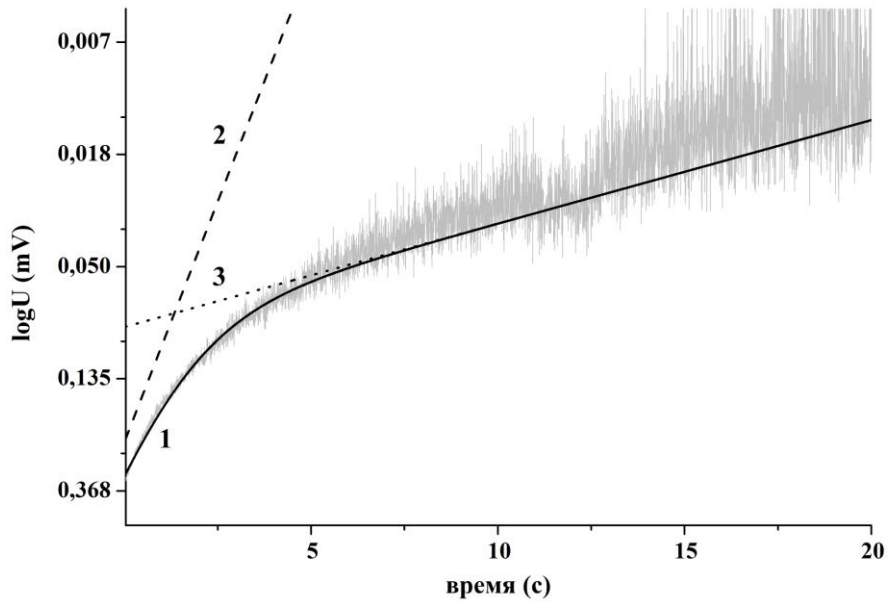


Рисунок 31. Представление кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции в логарифмическом масштабе ($\log U$) комплекса оливомицина А (1 мкМ) с ионами магния (50 мМ) при связывании с олигонуклеотидом Sp1/NFAT (20 мкМ) в виде суммы двух экспонент $U(t)=A_1e^{-\lambda_1 t}+A_2e^{-\lambda_2 t}$: экспериментальная кривая $U(t)$ (серый), аппроксимация экспериментальной кривой $U(t)$ (1); экспонента $A_1e^{-\lambda_1 t}$ (2), экспонента $A_2e^{-\lambda_2 t}$ (3).

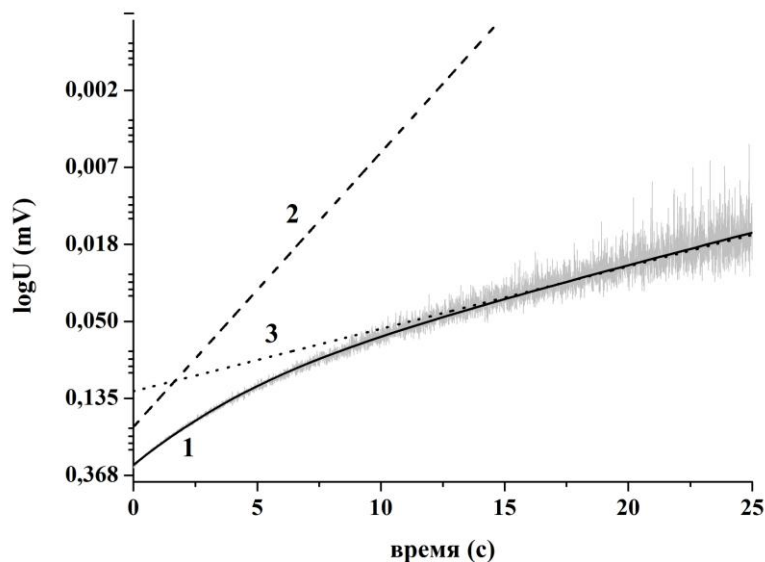


Рисунок 32. Представление кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции в логарифмической шкале ($\log U$) комплекса оливомицина А (2 мкМ) с ионами магния (50 мМ) при связывании с олигонуклеотидом Sp1/NFAT-m1 (50 мкМ) в виде суммы двух экспонент $U(t)=A_1e^{-\lambda_1 t}+A_2e^{-\lambda_2 t}$: экспериментальная кривая $U(t)$ (серый), аппроксимация экспериментальной кривой $U(t)$ (1); экспонента $A_1e^{-\lambda_1 t}$ (2), экспонента $A_2e^{-\lambda_2 t}$ (3).

Каждое из времен релаксации изменяется в зависимости от концентрации олигонуклеотидов (рисунки 33 и 34).

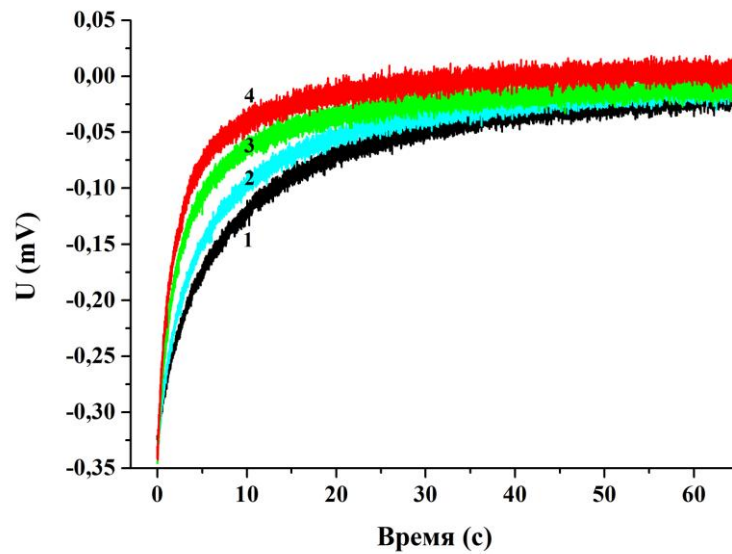


Рисунок 33. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции (U) комплекса оливомицина А (1 мкМ) с ионами магния (50 мМ) при связывании с олигонуклеотидом Sp1/NFAT (1 – 4 мкМ, 2 – 5 мкМ, 3 – 10 мкМ, 4 – 20 мкМ).

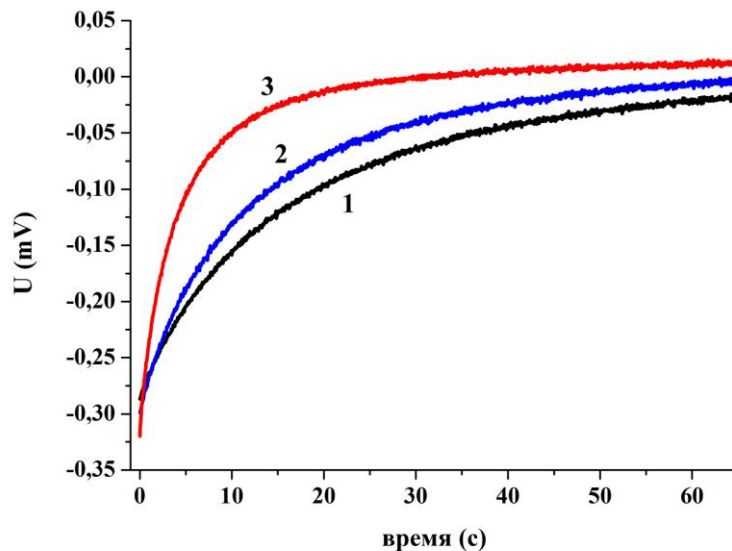
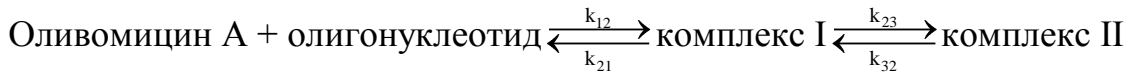


Рисунок 34. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции (U) комплекса оливомицина А (1 мкМ) с ионами магния (50 мМ) при связывании с олигонуклеотидом Sp1/NFAT-m1 (1 – 10 мкМ, 2 – 20 мкМ, 3 – 50 мкМ).

Наблюдаемые кинетические кривые можно объяснить механизмом двух последовательных реакций:



Первая стадия процесса характеризуется быстрым временем релаксации, вторая – более медленным, и их можно связать следующей серией уравнений **2**:

для первой стадии

$$\frac{1}{\tau_1} = \lambda_1 = k_{12} \cdot [\text{oligo}] + k_{21} \gg k_{23} + k_{32} \quad (2.1)$$

$$K_{eq1} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$$

для второй стадии

$$\frac{1}{\tau_2} = \lambda_2 = k_{32} + k_{23} \frac{K_{eq1} \cdot [\text{oligo}]}{K_{eq1} \cdot [\text{oligo}] + 1} \quad (2.2)$$

$$K_{eq2} = \frac{k_{23}}{k_{32}}$$

В соответствии с уравнениями **2.1** зависимость обратного времени релаксации первой стадии λ_1 процесса представляет собой прямую. На рисунках 35 и 36 показана экспериментальная и аппроксимированная в соответствии с уравнениями **2.1** зависимость λ_1 от концентрации олигонуклеотидов Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1, соответственно. На рисунках 37 и 38 приведены зависимости λ_2 (в соответствии с уравнениями **2.2**) от концентрации Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1, соответственно. Значения констант скоростей реакций приведены в таблице 6.

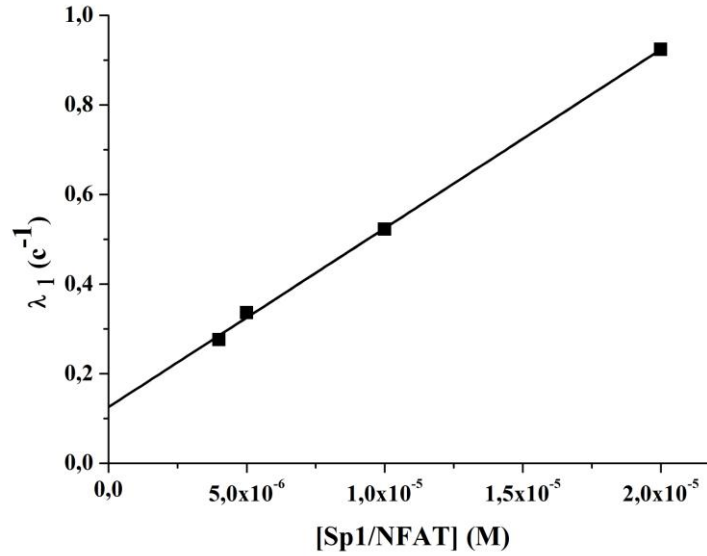


Рисунок 35. Зависимость обратного времени релаксации первой стадии процесса λ_1 комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT от концентрации Sp1/NFAT.

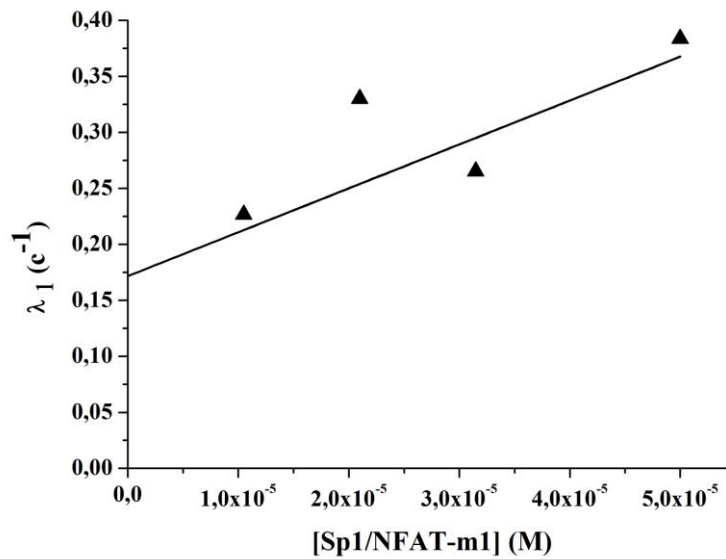


Рисунок 36. Зависимость обратного времени релаксации первой стадии процесса λ_1 комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT-m1 от концентрации Sp1/NFAT-m1.

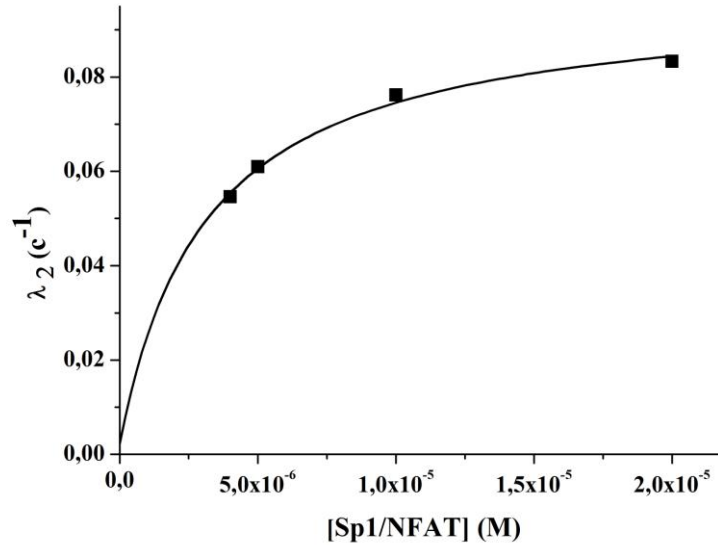


Рисунок 37. Зависимость обратного времени релаксации второй стадии процесса λ_2 комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT от концентрации Sp1/NFAT.

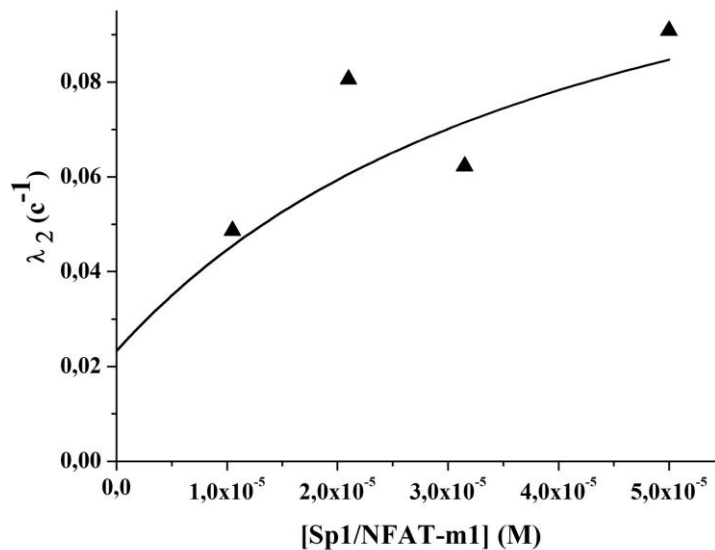


Рисунок 38. Зависимость обратного времени релаксации второй стадии процесса λ_2 комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT-m1 от концентрации Sp1/NFAT-m1.

Константу комплексообразования на основании приведенных выше кинетических данных рассчитывали по уравнению 3:

$$K_{eq} = K_{eq1} \cdot (1 + K_{eq2}) \quad (3)$$

Полученные значения констант комплексообразования представлены в таблице 6.

Таблица 6. Кинетические параметры комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1.

Название олигонуклеотида	$k_{12},$ $M^{-1}c^{-1}$	$k_{21},$ c^{-1}	$K_{eq1},$ M^{-1}	$k_{23},$ c^{-1}	$k_{32},$ c^{-1}	K_{eq2}	$K_{eq},$ M^{-1}
Sp1/NFAT	4×10^4	0,13	$3,08 \times 10^5$	0,1	$2,25 \times 10^{-3}$	44,4	$1,37 \times 10^7$
Sp1/NFAT-m1	$3,9 \times 10^3$	0,17	$2,3 \times 10^4$	0,12	$2,3 \times 10^{-2}$	5,2	$1,2 \times 10^5$

Данные, полученные кинетическим методом, согласуются с результатами флуоресцентного титрования, что может говорить о верности предложенной кинетической схемы.

По-видимому, быстрая компонента соответствует взаимодействию между сахарами антибиотика и олигонуклеотидами. Вероятно, в отличие от агликона более гибкая структура сахарных остатков позволяет быстрее вступить в реакцию с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1. Основываясь на экспериментальных данных можно предположить, что первая стадия является сиквенс-специфичной, так как зависит от состава олигонуклеотидов, и отражает взаимодействие сахаров оливомицина А с конкретными азотистыми основаниями олигонуклеотидов. Действительно, при замене всего 2 пар оснований константа скорости k_{12} первой стадии процесса комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT-m1 уменьшается на порядок величины по сравнению с таковой для Sp1/NFAT. Ранее был сделан вывод о том что для комплексообразования производных оливомицина А с дцДНК достаточно наличия в ее составе трехнуклеотидного GC-насыщенного участка. Но GC-насыщенный участок, состоящий из 3 пар оснований, в составе Sp1/NFAT-m1 оставался неизменным, что предполагало отсутствие изменения значений констант скоростей реакции комплексообразования. Однако изменение значений этих констант свидетельствует о том, что основания, находящиеся рядом с этим сайтом олигонуклеотида, также играют важную роль в стабилизации комплекса антибиотика с мишенью, взаимодействуя с ди- и трисахаридными частями антибиотика, предположительно, сиквенс-специфичным образом.

Вторая медленная стадия с большой долей вероятности опосредована встраиванием хромофорного участка молекулы в малый желоб олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1. Действительно, было показано, что взаимодействие хромофора антибиотика с ДНК связано с серьезными конформационными изменениями в составе ДНК, а именно локальным переходом из В-формы в А-форму, что характеризуется расширением малой бороздки ДНК [5, 71, 84, 85]. Логично предположить, что этот процесс будет более длительным и энергозатратным, что хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Вполне возможно, что вторая стадия отражает взаимодействие хромофора с GC-богатым тринуклеотидным сайтом олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, который присутствует в обоих олигонуклеотидах или в непосредственной близости с ним, поскольку константы скоростей реакций k_{23} для этой стадии практически совпадают для процессов комплексообразования как с Sp1/NFAT, так и с Sp1/NFAT-m1. Существенная разница между константами k_{32} для обоих процессов может говорить в пользу неполного совпадения структуры комплексов оливомицина А с этими двумя олигонуклеотидами.

Логично было бы предположить, что первая быстрая стадия процесса обусловлена неспецифическим взаимодействием оливомицина А с сахарофосфатным остовом олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1. Но тогда данная стадия должна быть постоянной вне зависимости от состава ДНК, что противоречит экспериментальным данным. Также это предположение входит в конфронтацию с литературными данными, где было показано отсутствие зависимости констант скоростей реакций от ионной силы раствора в широких пределах [83]. Важность сахаров при комплексообразовании с ДНК подтверждается результатами взаимодействия хромомицина А₃, его аналогов с частично удаленными сахарами и агликона хромомицина А₃ с ДНК. Действительно, по мере отщепления сахаров эффективность этого взаимодействия уменьшается, в то время как для агликона взаимодействие с ДНК зафиксировать не удалось [44]. Эффект селективности взаимодействия сахаров антибиотика с ДНК также был ранее показан на примере сахаросодержащего

ендиинового антибиотика калихеамицина. Его трисахаридная часть играет важную роль при распознавании тетрануклеотидного сайта связывания на ДНК, несущего пиримидиновые основания [86, 87].

Таким образом, на основе данных, полученных методом остановленной струи, был определен кинетический механизм взаимодействия оливомицина А с олигонуклеотидом, несущим сайт связывания Sp1 и NFAT, и его аналогами. Механизм описывается двумя стадиями, первой – быстрой и второй – более медленной, при этом каждая стадия зависит от состава олигонуклеотида. В связи с этим, первая стадия, по-видимому, характеризует взаимодействие сахарных остатков антибиотика с основаниями олигонуклеотидов, вторая, более медленная – встраивание хромофора антибиотика в узкую бороздку ДНК. Все стадии являются сиквенс-специфичными, то есть зависят от состава олигонуклеотидов. Константы скоростей реакций комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT в среднем на порядок выше таковых для Sp1/NFAT-m1, что подтверждает данные о крайне высокой специфичности данного взаимодействия. Константы комплексообразования, полученные на основе кинетических данных, хорошо согласуются с константами, полученными методом флуоресцентного титрования, что говорит о верности предложенной кинетической модели [88].

3.4 Физико-химические характеристики комплексообразования оливомицина А с жидкокристаллической дисперсией на основе ДНК.

Изучение физико-химических параметров комплексообразования физиологически-активных соединений ДНК-направленного действия с хжкд-ДНК представляет собой особый интерес в силу того, что упорядоченная система хжкд-ДНК моделирует ДНК в ее нативном состоянии в структуре хроматина, а взаимодействие лигандов с такой системой отражает характер взаимодействия антибиотиков с ДНК внутри клетки.

3.4.1 Исследование изменения структуры холестерической жидкокристаллической дисперсии на основе ДНК под действием оливомицина А методом кругового дихроизма.

Как известно, добавление ПЭГ и солей вызывает конденсацию дцДНК, формируя жидкокристаллическую фазу, которая характеризуется так называемой ψ -аномальной полосой [8, 27] в спектрах КД на длине волны около 270 нм, где поглощают азотистые основания ДНК. Важно отметить, что полоса КД конденсированной в холестерическую форму ДНК может быть на несколько порядков более интенсивной, чем для линейной дцДНК в растворе [8, 27], что делает данную систему крайне перспективной для изучения методом КД.

Как показано на рисунках 39 и 40, при увеличении концентрации оливомицина А изменяется интенсивность ψ -полосы хжкд-ДНК.

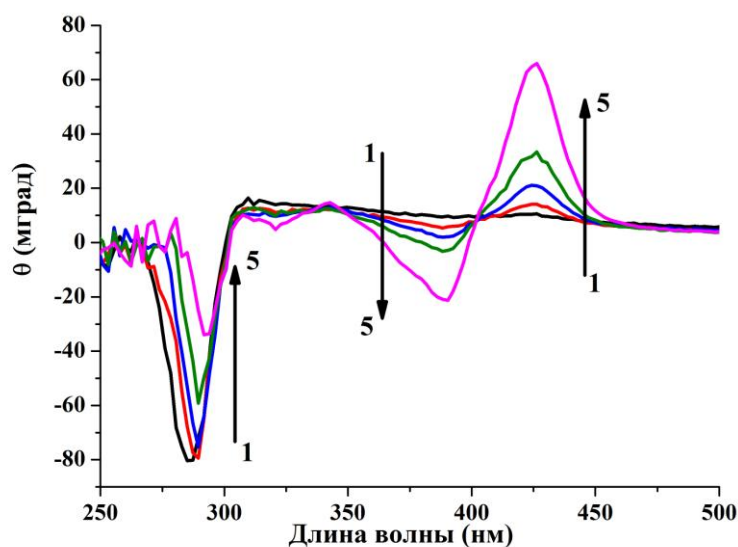


Рисунок 39. Спектры КД хжкд-ДНК ($[ДНК] = 3 \times 10^{-5}$ М п.о.) при добавлении увеличивающихся концентраций оливомицина А в М: 1 (черный) – 0; 2 (красный) – $1,6 \times 10^{-5}$; 3 (синий) – $2,4 \times 10^{-5}$; 4 (зеленый) – $4,8 \times 10^{-5}$; 5 (фиолетовый) – $1,04 \times 10^{-4}$.

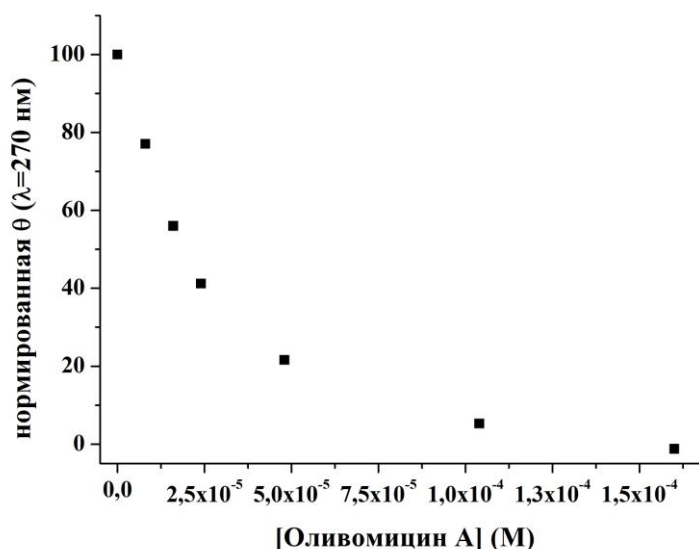


Рисунок 40. Зависимость нормированной амплитуды спектров КД ($\lambda = 270$ нм) хжкд-ДНК ($[ДНК] = 3 \times 10^{-5}$ М п.о.) от концентрации добавленного оливомицина А.

Из рисунков 39 и 40 видно, что уже при концентрации $2,4 \times 10^{-5}$ М оливомицина А происходит 50% уменьшение аномальной ψ -полосы хжкд-ДНК ($\lambda = 270$ нм), в то время как в диапазоне длин волн поглощения ЛСТА-254 появляются две полосы отрицательного и положительного знаков на 380 нм и 425 нм, соответственно. При нормировании сигналов за 100% принимали значение поглощения КД хжкд-ДНК без обработки антибиотиком. При достижении концентрации $1,6 \times 10^{-4}$ М антибиотика аномальная полоса дальнего порядка хжкд-ДНК уменьшилась до нуля (рисунок 40), что может говорить о переходе холестерической упаковки жидкокристаллической структуры в нематическую [29].

Другим методом, крайне чувствительным к перестроениям внутри биомакромолекул, является метод введения «внешнего» хромофора [28, 89]. Некоторые из молекул могут служить в качестве меток для изучения супрамолекулярных структур с аномально высокими хиральными характеристиками, таких как хжкд-ДНК. Молекула «внешнего» хромофора, находящаяся в комплексе с хжкд-ДНК, в видимом диапазоне длин волн проявляет такие изменения в спектре КД, как и высокоорганизованная структура на основе дцДНК. Таким образом, по изменению сигнала КД от «внешнего» хромофора

можно фиксировать изменения, которые могут быть результатом взаимодействия таких упорядоченных структур с биологически-активными молекулами.

На рисунке 41 показаны спектры КД комплексов хжкд-ДНК с красителем-интеркалятором митоксантроном, а также в присутствии антибиотика оливомицина А. При добавлении митоксантрона к образцу, содержащему комплекс оливомицина А и хжкд-ДНК, индуцированный сигнал КД молекулы-интеркалятора в полосе поглощения от 500 до 750 не проявился. В то же время добавление к образцу, содержащему комплекс митоксантрона с хжкд-ДНК, LСТА-254 также приводило к идентичному результату. Параллельно с исчезновением полосы индуцированного КД молекулы-интеркалятора сигнал аномальной ρsi -полосы хжкд-ДНК на длине волны азотистых оснований 270 нм также исчезал.

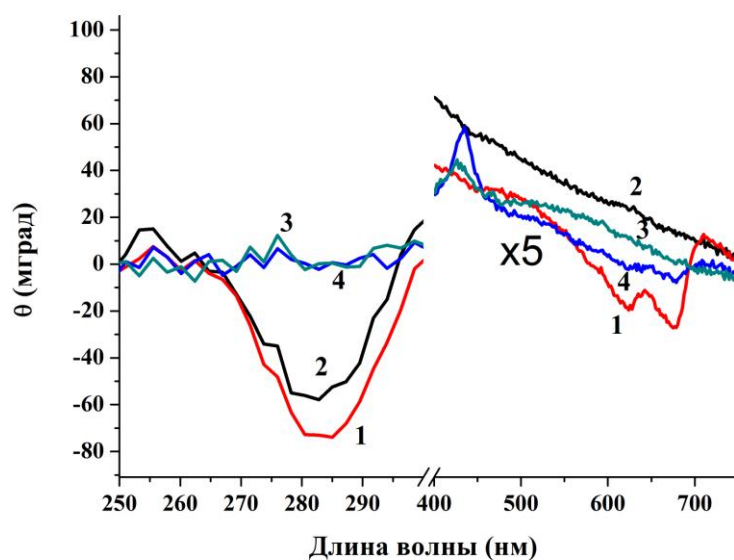


Рисунок 41. Спектры КД хжкд-ДНК ($[\text{ДНК}] = 3 \times 10^{-5} \text{ М п.о.}$) в комплексе с красителем митоксантроном ($5 \times 10^{-6} \text{ М}$) (интенсивность КД сигнала в диапазоне 400 – 750 нм увеличена в 5 раз) и в присутствии оливомицина А ($1,5 \times 10^{-4} \text{ М}$): 1 (красный) – хжкд-ДНК в комплексе с митоксантроном; 2 (черный) – хжкд-ДНК; 3 (зеленый) – хжкд-ДНК в комплексе с митоксантроном в присутствии оливомицина А; 4 (синий) – хжкд-ДНК в присутствии оливомицина А.

Подобный эффект был более подробно изучен с применением другого хорошо известного интеркалятора тиазолового оранжевого (ТО). При комплексообразовании с хжкд-ДНК тиазоловый оранжевый имеет отрицательный

индуцированный КД сигнал при длине волны 510 нм, который хорошо разрешается с КД сигналом оливомицина А, который проявляется в диапазоне до 450 нм. Рисунок 42 демонстрирует спектры КД системы, содержащей постоянные концентрации хжкд-ДНК и красителя ТО, при добавлении увеличивающихся концентраций оливомицина А.

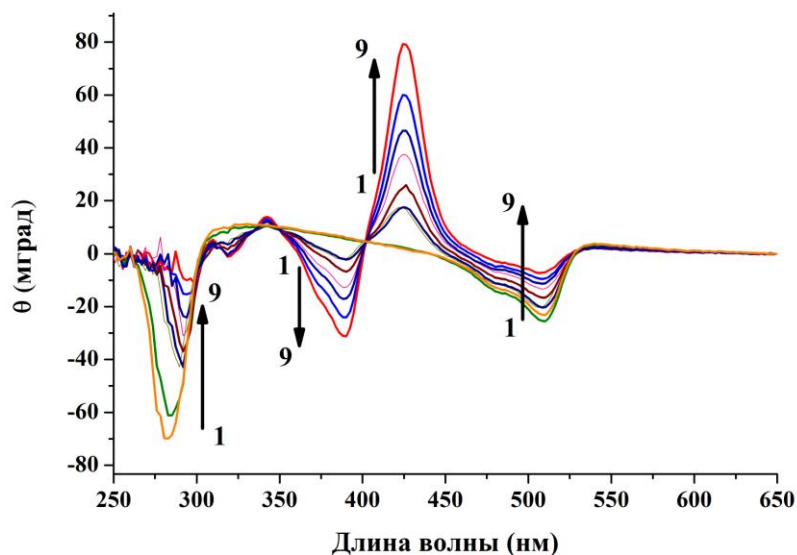


Рисунок 42. Спектры КД комплекса красителя ТО ($1,5 \times 10^{-5}$ М) с хжкд-ДНК ($[ДНК] = 3 \times 10^{-5}$ М п.о.) при добавлении увеличивающихся концентраций оливомицина А в М: 1 – 0; 2 – 5×10^{-6} ; 3 – $7,5 \times 10^{-6}$; 4 – $1,5 \times 10^{-5}$; 5 – $2,8 \times 10^{-5}$; 6 – $4,5 \times 10^{-5}$; 7 – 6×10^{-5} ; 8 – $7,5 \times 10^{-5}$; 9 – 1×10^{-4} .

На рисунках 43 и 44 показаны концентрационные зависимости полос КД хжкд-ДНК на длинах волн 270 нм (рисунок 43), где поглощают азотистые основания ДНК, и 510 нм (рисунок 44), длине волны индуцированного КД красителя-интеркалятора ТО, который был использован в качестве метки для мониторинга состояния высокоорганизованной структуры на основе ДНК. Важно отметить схожий возрастающий характер концентрационных зависимостей амплитуд спектров КД при обеих длинах волн. Аномальная ψ -полоса хжкд-ДНК на длине волны азотистых оснований практически полностью исчезает при концентрации добавленного оливомицина А равной 1×10^{-4} М. В то же самое время при увеличении концентрации антибиотика резко сокращается амплитуда спектров индуцированного КД молекулы-интеркалятора ТО, что так же подтверждает эффект изменения структуры хжкд-ДНК.

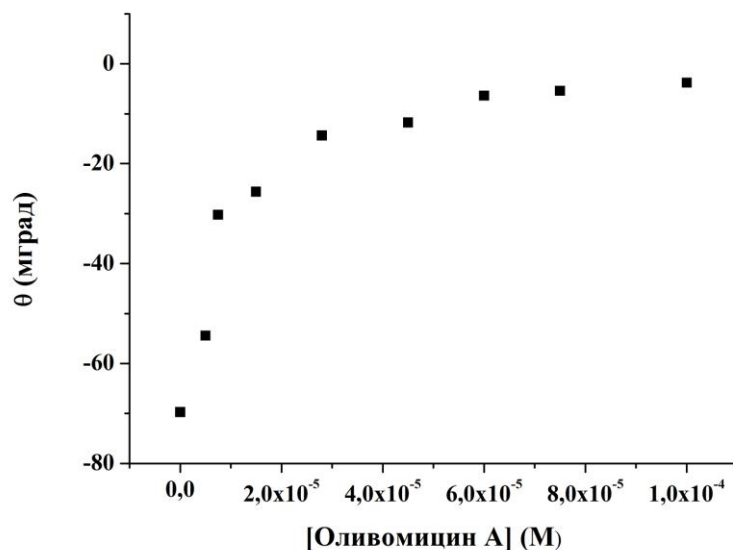


Рисунок 43. Зависимость значения амплитуд спектров КД комплекса красителя ТО ($1,5 \times 10^{-5}$ М) с хжкд-ДНК ($[ДНК] = 3 \times 10^{-5}$ М п.о.) на длине волны хжкд-ДНК 270 нм добавлении увеличивающихся концентраций оливомицина А.

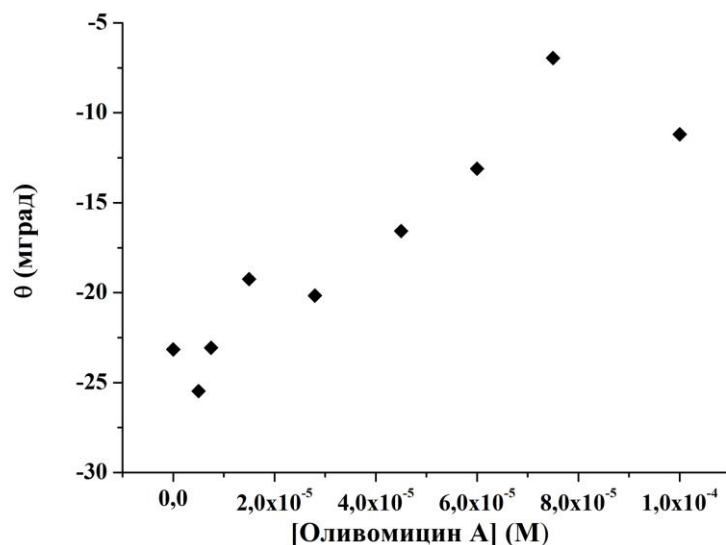


Рисунок 44. Зависимость значения амплитуд спектров КД комплекса красителя ТО ($1,5 \times 10^{-5}$ М) с хжкд-ДНК ($[ДНК] = 3 \times 10^{-5}$ М п.о.) на длине волны красителя ТО 510 нм добавлении увеличивающихся концентраций оливомицина А.

Данные, полученные методом КД, указывают на комплексообразование оливомицина А с хжкд-ДНК. В силу сложной формы спектра КД оливомицина А в комплексе с хжкд-ДНК тяжело судить о типе взаимодействия антибиотика с хжкд-ДНК. Спектр антибиотика имеет собственные две полосы отрицательного и

положительного знаков, которые при взаимодействии с хжкд-ДНК незначительно увеличиваются по амплитуде без значительного сдвига по длине волны. Можно предположить, что при взаимодействии с хжкд-ДНК происходит накопление оливомицина А между квазинематическими слоями или комплексобразование с дцДНК в структуре хжкд-ДНК, что приводит к изменению структуры жидкокристаллической дисперсии.

Метод «внешнего» хромофора крайне чувствителен к перестройкам высокоорганизованных структур на основе ДНК. Благодаря компактной упаковке молекул дцДНК в составе хжкд-ДНК сигнал индуцированного КД введенного красителя на 1–2 порядка интенсивнее, по сравнению с таким сигналом в комплексе с линейной дцДНК в буферном растворе, благодаря чему такой краситель может служить удобным маркером состояния системы. При добавлении оливомицина А к системе, представляющей собой комплекс тиазолового оранжевого и хжкд-ДНК, сигнал молекулы-интеркалятора в видимой области спектра уменьшается, и параллельно с этим сигнал ψ -полосы в УФ-диапазоне также постепенно нивелируется. Важно отметить, что в то время как при высоких концентрациях оливомицина А полоса хжкд-ДНК полностью исчезла, полоса индуцированного КД введенного хромофора не стала полностью идентичной сигналу КД тиазолового оранжевого в буфере. По-видимому, взаимодействие оливомицина А со сверхконденсированной ДНК приводит к нематизации слоев в структуре хжкд-ДНК, но не нарушает или слабо дезорганизует вторичную структуру ДНК в составе квазинематических слоёв.

Логично предположить, что для изменения оптических свойств (пространственной организации) хжкд-ДНК молекулы антибиотиков должны взаимодействовать с молекулами дцДНК, находящимися на границах квазинематических слоев, таким образом, важным аспектом является аффинность молекул антибиотиков к дцДНК.

По-видимому, нейтрализация отрицательных зарядов фосфатных остатков ДНК положительно заряженными катионами натрия, а также применение ПЭГ, облегчает взаимодействие анионного при нейтральном значении рН антибиотика

с ДНК, в силу отсутствия зарядового барьера. Установление высоких локальных концентраций дцДНК за счет эффекта внутримолекулярного сжатия и фазового исключения [25] также способствует комплексообразованию.

Проведенные ранее теоретические расчеты и экспериментальные данные демонстрировали, что ионные или сильнополярные группы в молекулах биологически-активных соединений, например, класса антрациклинов способны связываться с дцДНК и инвертировать аномальную ψ -полосу высокоорганизованных структур на основе ДНК, образуя цепочки поперечных диполей вдоль оси молекул дцДНК [28-30]. В соответствии с предложенной теорией [30] вклад взаимодействия между цепочками поперечных диполей строго зависит от расстояния между полярными или заряженными группами молекул, образующих комплексы с хжкд-ДНК. Таким образом, находясь на достаточно близком расстоянии друг от друга, заряженные группы молекул антибиотика, расположенных на ДНК, в виде поперечных диполей обеспечивают значительный вклад в общий потенциал взаимодействия хиральных молекул. Данный вклад может быть достаточным, для того чтобы обратить в ноль или инвертировать закрутку хжкд-ДНК, превращая, таким образом, холестерический жидкий кристалл в нематический, а затем нематический жидкий кристалл в холестерический кристалл, но с обратной первоначальному состоянию закруткой. Такая ситуация может быть реализована при высоких концентрациях антибиотика, связанного с хжкд-ДНК, когда уровни заполнения хжкд-ДНК оливомицином А достаточны, для того чтобы обеспечить малые расстояния между полярными группами антибиотика в цепочке поперечных диполей. Объяснением эффекта инвертирования полосы дальнего порядка хжкд-ДНК под действием оливомицина А может служить наличие в составе В-оливомозы антибиотика метокси-группы с высокой полярностью, что позволяет выстроить спираль диполей на цепочке дцДНК в составе хжкд-ДНК.

4. Выводы.

1. Оливомицин А (LСТА-254) имеет наибольшую константу комплексообразования с ДНК и квантовый выход в комплексе с ДНК по сравнению с другими его производными, несущими различные ацильные заместители в составе А-олиозы и Е-оливомикозы, что объясняется наиболее высокой гидрофобностью LСТА-254. Частичное или полное деацилирование LСТА-254 и LСТА-1721 с получением новых производных LСТА-1840 и LСТА-1839 привело к снижению гидрофобности молекул и, как следствие, к утрате способности образовывать комплексы с ДНК.

2. Производное LСТА-1498, содержащее карбоксильную группу в боковой цепи агликона, обладает на порядок меньшей константой комплексообразования с ДНК по сравнению с его N,N-диметиламиноэтиламидом, LСТА-1599, в связи с меньшей гидрофобностью первого и электростатическим барьером между отрицательно заряженными карбоксильной группой лиганда и сахарофосфатным остовом ДНК.

3. Оливомицин А проявляет высокое сродство и специфичность к сайту связывания транскрипционного фактора Sp1 в составе олигонуклеотидов. Константа комплексообразования этого антибиотика с олигонуклеотидом Sp1/NFAT на два порядка выше, чем с дцДНК, а замена GC-оснований на AT в структуре дуплекса Sp1/NFAT приводит к существенному уменьшению константы комплексообразования оливомицина А с модифицированными олигонуклеотидами.

4. Установлен кинетический механизм взаимодействия оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его модифицированными аналогами. Согласно предложенной модели процесс комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его аналогами состоит из двух последовательных реакций. Константы скоростей реакций комплексообразования резко изменяются в зависимости от состава олигонуклеотидов.

5. Взаимодействие оливомицина А с холестерической жидкокристаллической дисперсией на основе ДНК приводит к нарушению

холестерической структуры дисперсии, связанному с переходом дисперсии из холестерической формы в нематическую.

Список литературы.

1. Lombó, F. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives / F. Lombó, N. Menéndez, J. A. Salas, C. Méndez // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 73. – P.1–14.
2. Deacon, K. Elevated SP-1 transcription factor expression and activity drives basal and hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-small cell lung cancer / K. Deacon, D. Onion, R. Kumari, S. A. Watson, A. J. Knox // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – Issue 47. – P.39967–39981.
3. Previdi, S. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts / S. Previdi, A. Malek, V. Albertini, C. Riva, C. Capella, M. Broggin, G. M. Carbone, J. Rohr, C. V. Catapano // *Gynecol. Oncol.* – 2010. – V. 118. – Issue 2. – P.182–188.
4. Keniry, M. A. Nuclear Magnetic Resonance Comparison of the Binding Sites of Mithramycin and Chromomycin on the Self-complementary Oligonucleotide d(ACCCGGGT)₂ / M. A. Keniry, D. L. Banville, P. M. Simmonds, R. H. Shafer // *J. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 231. – P.753–767.
5. Keniry, M.A. NMR studies of the interaction of chromomycin A3 with small DNA duplexes I / M. A. Keniry, S. C. Brown, E. Berman, R. H. Shafer // *Biochemistry.* – 1987. – V. 26. – Issue 4. – P.1058–1067.
6. Liu, C. Oligonucleotide studies of sequence-specific binding of chromomycin A3 to DNA / C. Liu, F. M. Chen // *Biochemistry.* – 1994. – V. 33 – Issue 6. – P.1419–1424.
7. Kornberg, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA / R. D. Kornberg // *Science.* – 1974. – V. 184. – Issue 4139. – P.868–871.
8. Yevdokimov, Y.M. The Liquid-Crystalline Phases of Double-Stranded Nucleic Acids in Vitro and in Vivo / Y. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, V. I. Salyanov // *Liquid Crystals.* – 1988. – V. 3. – Issue 11. – P.1443–1459.

9. Колесникова, Д. В. ДНК-специфичные низкомолекулярные соединения: учебное пособие / Д. В. Колесникова, А. Л. Жузе, А. С. Заседателев – Москва: МФТИ, 1998. – 123 с.
10. Muller, W. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 2. Influence of substituents on the base and sequence specificity of intercalating ligands / W. Muller, H. Bunemann, N. Dattagupta // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – V. 54. – Issue 1. – P.279–291.
11. Muller, W. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands / W. Muller, D. M. Crothers // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – V. 54. – Issue 1. – P. 267–277.
12. Muller, W. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A - T-specific non-intercalating DNA ligands / W. Muller, F. Gautier // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – V. 54. – Issue 2. – P. 385–394.
13. Bigey, P. DNA cleavage by a metalloporphyrin-spermine-oligonucleotide molecule / P. Bigey, G. Pratviel, B. Meunier // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1995. – Issue 2. – P.181–182.
14. Zasedatelev, A. S. Binding of netropsin to DNA and synthetic polynucleotides / A. S. Zasedatelev, G. V. Gursky, Ch. Zimmer, H. Thrum // *Mol. Biol. Rep.* – 1974. – V. 1. – Issue 6. – P.337–342.
15. Zimmer, Ch. Effects of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acids / Ch. Zimmer // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1975. – V. 15. – P.285–318.
16. Zimmer, Ch. Nonintercalating DNA binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material / Ch. Zimmer, U. Wahnert // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1986. – V. 47. – Issue 1. – P.31–112.
17. Mrksich, M. Antiparallel side-by-side dimeric motif for sequence-specific recognition in the minor groove of DNA by the designed peptide 1-methylimidazole-2-carboxamide netropsin / M. Mrksich, W. S. Wade, T. J. Dwyer, B. H. Geierstranger, D.

E. Wemmer, P. B. Dervan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – Issue 16. – P.7586–7590.

18. Wade, W. S. Design of peptides that bind in the minor groove of DNA at 5'-(AT)G(A,T)C(AT)-3' sequences by a dimeric side-by-side motif / W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan // *J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – V. 114. – P.8783–8794.

19. Tuite, E. Methylene blue intercalates with poly(dT)-poly(dA)-poly(dT) but not duplex poly(dA)-poly(dT) / E. Tuite, B. Norden // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1995. – Issue 1. – P.53–54.

20. Kirn, S.K. Methyl green. A DNA major-groove binding drug / S.K. Kirn, B. Norden // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 315. – Issue 1. – P.61–64.

21. Borowy-Borowski, H. Recognition between mitomycin C and specific DNA sequences for cross-link formation / H. Borowy-Borowski, R. Lipman, M. Tomasz // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29. – Issue 12. – P.2999–3006.

22. Petrussek, R. L. Pyrrol[1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the in vitro deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycins A and B / R. L. Petrussek, G. L. Anderson, T. F. Garner, Q. L. Fannin, D. J. Kaplan, S. G. Zimmer, L. H. Hurley // *Biochemistry.* – 1981. – V. 20. – Issue 5. P.1111–1119.

23. Reynolds, V. L. Reaction of the antitumor antibiotic CC-1065 with DNA. Location of the site of thermally induced strand breakage and analysis of DNA sequence specificity. / V. L. Reynolds, I. J. Molineux, D. J. Kaplan, D. H. Swenson, L. H. Hurley // *Biochemistry.* – 1985. – V. 24. – Issue 22. – P. 6228–6237.

24. Hurley, L. H. Sequence specificity and biological consequences of drugs that bind covalently in the minor groove of DNA / L. H. Hurley, D. R. Needham-VanDevanter // *Basic Life Sci.* – 1986. – V. 38 – P.203–210.

25. Евдокимов, Ю. М. Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК / Ю. М. Евдокимов, В. И. Салянов, С. В. Семенов, С. Г. Скуридин. – М.: Изд-во «Радиотехника», 2008. – 296 с.

26. Livolant, F. Circular dichroism microscopy of compact forms of DNA and chromatin in vivo and in vitro: cholesteric liquid-crystalline phases of DNA and single

dinoflagellate nuclei / F. Livolant, M. F. Maestre // *Biochemistry*. – 1988. – V. 27 – Issue 8. – P.3056–3068.

27. Evdokimov Iu. M. Formation of the compact form of double-stranded DNA in solution in the presence of polyethylene glycol / Iu. M. Evdokimov, N. M. Akimenko, N. E. Glukhova, A. S. Tikhonenko, Ia. M. Varshavskii // *Mol. Biol.* – 1973. – V. 7. – Issue 1. – P.151–159.

28. Belyakov, V. A. Comparison of calculated and observed CD spectra of liquid crystalline dispersions formed from double-stranded DNA and from DNA complexes with coloured compounds / V. A. Belyakov, V. P. Orlov, S. V. Semenov, S. G. Skuridin, Y. M. Yevdokimov // *Liquid Crystals*. – 1996. – V. 20. – Issue 6. – P.777–784.

29. Bustamante, C. Daunomycin inverts the long-range chirality of DNA condensed states / C. Bustamante, B. Samori, E. Builes // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30 – Issue 23. – P. 5661–5666.

30. Samori, B. Transverse dipoles added to DNA chains by drug binding can induce inversion of the long-range chirality of DNA condensates / B. Samori, M. A. Osipov, I. Domini, A. Bartolini // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1993. – V. 15. – Issue 6. – P.353–359.

31. Yevdokimov Yu. M. A mesophase (liquid crystal) state of DNA complexes with anthracycline antibiotics / Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, A. T. Dembo, H. Berg // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1983. – V. 42. – Issue 7–8. – P.855–866.

32. Yevdokimov Yu, M. Two modes of long-range orientation of DNA bases realized upon compaction / Yu. M. Yevdokimov, V.I. Salyanov, H. Berg // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – V. 9. – Issue 3. –P.743–752.

33. Akimenko, N. A study of interactions of platinum (II) compounds with DNA by means of CD spectra of solutions and liquid crystalline microphases of DNA / N. Akimenko, P. Cheltsov, Z. Balcarova, V. Kleinwachter, Yu. Yevdokimov // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1985. – V. 4. – Issue 6. – P.597–608.

34. Akimenko, N. Liquid crystalline microphases of DNA molecules complexed with compounds of platinum(II) / N. Akimenko, V. Kleinwachter, Y. Yevdokimov // *FEBS Lett.* – 1983. – V. 156. – Issue 1. – P.58–62.

35. Yevdokimov, Yu. M. Effect of platinum(II) chemotherapeutic agents on properties of DNA liquid crystals / Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, V. I. Salyanov, G. Damaschun, H. Damaschun, R. Misselwitz, V. Kleinwächter // *Biophys. Chem.* – 1990. – V. 35. – Issue 2–3. – P.143–153.
36. Киселева, О. А. Зависимость между структурой и активностью антибиотиков группы ауреоловой кислоты. Образование комплексов с ДНК и подавление синтеза РНК / О. А. Киселева, Н. Г. Волкова, Е. А. Стукачева, М. Ф. Шемякин, Ю. А. Берлин, М. Н. Колосов // *Мол. биология.* – 1973. – Вып. 7. – С.900–907.
37. Kumar, V. Preparation and antitumor activity of olivomycin A analogues / V. Kumar, W. A. Remers, W. T. Bradner // *J. Med. Chem.* – 1980. – V. 23. – Issue 4. – P.376–379.
38. Remsing, L. L. Inhibition of c-src Transcription by Mithramycin: Structure-Activity Relationships of Biosynthetically Produced Mithramycin Analogues Using the c-src Promoter as Target / L. L. Remsing, H. R. Bahadori, G. M. Carbone, E. M. McGuffie, C. V. Catapano, J. Rohr // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – Issue 27. – P.8313–8324.
39. Remsing, L. L. Mithramycin SK A novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and demycarosyl-mithramycin SK: three new products generated in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* through combinatorial biosynthesis / L. L. Remsing, A. M. González, M. Nur-e-Alam, M. J. Fernández-Lozano, A. F. Braña, U. Rix, M. A. Oliveira, C. Méndez, J. A. Salas, and J. Rohr // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – Issue 19. – P.5745–5753.
40. Кучкарев, Р. Н. Предварительные результаты клинических исследований антибиотика оливомицина / Р. Н. Кучкарев // *Антибиотики.* – 1962. – Вып. 7. – С.67–70.
41. Гаузе, Г. Ф. Получение и механизм действия противоопухолевого антибиотика оливомицина / Г. Ф. Гаузе, Р. С. Ухолина, М. А. Свешникова // *Антибиотики.* – 1962. – Вып. 7. – С.34–38.

42. Kurnit, D. M. Multiple satellite deoxyribonucleic acids in the calf and their relation to the sex chromosomes / D. M. Kurnit, B. R. Shafit, J. J. Maio // *J. Mol. Biol.* – 1973. – V. 81. – Issue 3. – P.274–284.
43. Симонова, В. С. Оливомицин вызывает апоптоз опухолевых клеток и подавляет р53-индуцированную транскрипцию / В. С. Симонова, А. В. Самусенко, Н. А. Филлипова, А. Н. Тевяшова, Л. С. Лынин, Г. И. Кулик, В. Ф. Чехун, А. А. Штиль // *БЭБиМ.* – 2005. – Т. 139. – Вып. 4. – С.451–455.
44. Hayasaka, T. Chromomycin A₃ studies in aqueous solutions. Spectrophotometric evidence for aggregation and interaction with herring sperm deoxyribonucleic acid / T. Hayasaka, Y. Inoue // *Biochemistry.* – 1969. – V. 8. – Issue 6. – P.2342–2347.
45. Макаров, В. Л. Круговой дихроизм комплексов ДНК с красителями. III Эффект скрытой оптической активности и структура комплексов / В. Л. Макаров, А. И. Полетаев, П. Т. Свешников, Н. О. Кондратьева, В. Ф. Писемский, Я. Доскочил, Я. Коуделка, М. В. Волькенштейн // *Мол. биология.* – 1979. – Вып. 14. – С.450 – 468.
46. Van Dyke, M. W. Chromomycin, mithramycin, and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid. Footprinting with (methidiumpropyl-EDTA)iron(II) / M. W. Van Dyke, P. B. Dervan // *Biochemistry.* - 1983. – V. 22. – Issue 10. – P.2373–2377.
47. Bianchi, N. Targeting of the Sp1 binding sites of HIV-1 long terminal repeat with chromomycin. Disruption of nuclear factor-DNA complexes and inhibition of in vitro transcription / N. Bianchi, M. Passadore, C. Rutigliano, G. Feriotto, C. Mischiati, R. Gambari // *Biochem. Pharmacol.* – 1996. – V. 52 – Issue 10. – P.1489–1498.
48. Phillips, A. GC-selective DNA-binding antibiotic, mithramycin A, reveals multiple points of control in the regulation of Hdm2 protein synthesis / A. Phillips, M. Darley, J. P. Blaydes // *Oncogene.* – 2006. – V. 25. – Issue 30. – P.4183–4193.
49. Sleiman, S.F. Mithramycin is a gene-selective Sp1 inhibitor that identifies a biological intersection between cancer and neurodegeneration / S. F. Sleiman, B. C. Langley, M. Basso, J. Berlin, L. Xia, J. B. Payappilly, M. K. Kharel, H. Guo, J. L. Marsh, L. M. Thompson, L. Mahishi, P. Ahuja, W. R. MacLellan, D. H. Geschwind, G.

- Coppola, J. Rohr, R. R. Ratan // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31. – Issue 18. – P.6858–6870.
50. Vizcaino, C. Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes / C. Vizcaíno, S. Mansilla, L.-E. Núñez, C. Méndez, J. A. Salas, F. Morís, J. Portugal // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – V. 84 – Issue 9. – P.1133–1142.
51. Bianchi, N. The DNA-binding drugs mithramycin and chromomycin are powerful inducers of erythroid differentiation of human K562 cells / N. Bianchi, F. Osti, C. Rutigliano, F. G. Corradini, E. Borsetti, M. Tomassetti, C. Mischiati, G. Feriotto, R. Gambari // *Br. J. Haematol.* – 1999. – V. 104. – Issue 2. – P.258–265.
52. Averbukh, L. A. Seasonal changes in the rate of development and sensitivity of lymphosarcoma to olivomycin in male and female albino mice / L. A. Averbukh, V. A. Shorin // *Antibiotiki.* – 1971. – V. 16 – Issue 3. – P.224–228.
53. Tevyashova, A. N. Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics / A. N. Tevyashova, A. A. Shtil, E. N. Olsufyeva, Y. N. Luzikov, M. I. Reznikova, L. G. Dezhenkova, E. B. Isakova, V. M. Bukhman, N. A. Durandin, A. M. Vinogradov, V. A. Kuzmin, M. N. Preobrazhenskaya // *Bioorg. Med. Chem.* – 2011. – V. 19. – Issue 24. – P.7387–7393.
54. Gause, G. F. Olivomycin, mithramycin, chromomycin: three related cancerostatic antibiotics / G. F. Gause // *Adv. Chemother.* – 1965. – V. 2. – P.179–195.
55. Chen, S. Y. Molecular dynamics study on the interaction of a mithramycin dimer with a decanucleotide duplex / S. Y. Chen, T. H. Lin // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – V. 109. – Issue 19. – P.9764–9772.
56. Chen, K.-X. Modelling basic features of specificity in DNA-aureolic acid-derived antibiotic interactions / K.-X. Chen, N. Gresh, X. Hui, B. Pullman, K. Zakrzewska // *FEBS lett.* – 1989. – V. 245. – Issues 1–2. – P.145–149.
57. Kersten, W. Physicochemical properties of complexes between DNA and antibiotics which affect RNA synthesis / W. Kersten, H. Kersten, W. Szybalsky // *Biochemistry.* – 1966. – V. 5. – P.236–244.

58. Pitina, L. R. Interaction of the antitumor antibiotic olivomycin with Mg^{2+} ions / L. R. Pitina, E. P. Baranov, B. I. Grinchenko, B. Kh. Brikenshtein, G. M. Barenboim // *Antibiotiki*. – 1981. – V. 26. – Issue 12. – P.906–912.
59. Brikenshtein, V. Kh. Luminescence absorption properties of the olivomycin molecule and its complex with DNA / V. Kh. Brikenshtein, E. P. Baranov, B. I. Grinchenko, L. R. Pitina, G. N. Barenboim // *Antibiotiki*. – 1983. – V. 28. – Issue 5. – P.346–351.
60. Fox, K. R. Investigations into the sequence-selective binding of mithramycin and related ligands to DNA / K. R. Fox, N. R. Howarth // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – V. 13. – Issue 24. – P.8695–8714.
61. Cons, B. M. High resolution hydroxyl radical footprinting of the binding of mithramycin and related antibiotics to DNA / B. M. Cons, K. R. Fox // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17 – Issue 14 – P.5447–5459.
62. Carpenter, M. L. DNA-sequence binding preference of the GC-selective ligand mithramycin. Deoxyribonuclease-I/deoxyribonuclease-II and hydroxy-radical footprinting at CCCG, CCGC, CGGC, GCCC and GGGG flanked by (AT)_n and An.Tn / M. L. Carpenter, J. N. Marks, K. R. Fox // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 215 – Issue 3. – P.561–566.
63. Hou, Ming-Hon. Crystal structure of the $[Mg^{2+}-(chromomycin\ A_3)_2]$ -d(TTGGCCAA)₂ complex reveals GGCC binding specificity of the drug dimer chelated by a metal ion / M.H. Hou, H. Robinson, Y.G. Gao, A. H.-J. Wang // *Nucleic Acids Res.* – 2004.. – V. 32. – Issue 7. – P.2214–2222.
64. Banville, D. L. NMR investigation of mithramycin A binding to d(ATGCAT)₂: a comparative study with chromomycin A3 / D. L. Banville, M. A. Keniry, R. H. Shafer // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – Issue 39. – P.9294–9304.
65. Sastry, M. Solution structure of the mithramycin dimer-DNA complex / M. Sastry, D. J. Patel // *Biochimie*. – 2008. – V. 90 – Issue 7. – P.988–998.
66. Keniry, M. A. The Three-Dimensional Structure of the 4:1 Mithramycin:d(ACCCGGGT)₂ Complex: Evidence for an Interaction Between the E

Saccharides / M. A. Keniry, E. A. Owen, R. H. Shafer // *Biopolymers*. – 2000. – V. 54. – Issue 2. – P.104–114.

67. Aich, P. Role of Mg^{++} in the mithramycin-DNA interaction: evidence for two types of mithramycin- Mg^{++} complex / P. Aich, D. Dasgupta // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – V. 173. – Issue 2. – P.689–696.

68. Aich, P. Interaction between antitumor antibiotic chromomycin A_3 and Mg^{2+} . I. Evidence for the formation of two types of chromomycin A_3 - Mg^{2+} complexes / P. Aich, R. Sen, D. Dasgupta // *Chem. Biol. Interact.* – 1992. – V. 83. – Issue 1. – P.23–33.

69. Aich, P. Role of magnesium ion in the interaction between chromomycin A_3 and DNA: binding of chromomycin A_3 - Mg^{2+} complexes with DNA / P. Aich, R. Sen, D. Dasgupta // *Biochemistry*. – 1992. – V. 31. – Issue 11. – P.2988–2997.

70. Chakrabarti, S. Role of Mg^{2+} in the interaction of anticancer antibiotic, chromomycin A_3 with DNA: does neutral antibiotic bind DNA in absence of the metal ion? S. Chakrabarti, P. Aich, D. Sarker, D. Bhattacharyya, D. Dasgupta/ *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2000. – V. 18. – Issue 2. – P.209–218.

71. Chakrabarti, S. Structural Basis of DNA Recognition by Anticancer Antibiotics, Chromomycin A_3 , and Mithramycin: Roles of Minor Groove Width and Ligand Flexibility / S. Chakrabarti, D. Bhattacharyya, D. Dasgupta // *Biopolymers*. – 2001. – V. 56. – P.85–95.

72. Chakrabarti, S. Interactions of chromomycin A_3 and mithramycin with the sequence $d(TAGCTAGCTA)_2$ / S. Chakrabarti, D. Dasgupta // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2001. – V. 38. – Issue 1–2. – P.64–70.

73. Chakrabarti, S. Differential Interactions of Antitumor Antibiotics Chromomycin A_3 and Mithramycin with $d(TATGCATA)_2$ in Presence of Mg^{2+} / S. Chakrabarti, M. A. Mir, D. Dasgupta // *Biopolymers (Biospectroscopy)*. – 2001. – V. 62. – P.131–140.

74. Chakrabarti, S. Interaction of Mithramycin and Chromomycin A_3 with $d(TAGCTAGCTA)_2$: Role of Sugars in Antibiotic-DNA Recognition: S. Chakrabarti, B. Bhattacharyya, D. Dasgupta // *J.Phys. Chem. B*. – 2002. – V. 106. – P.6947–6953.

75. Majee, S. Differential Interactions of the Mg^{2+} Complexes of Chromomycin A_3 and Mithramycin with Poly(dG-dC).Poly(dC-dG) and Poly(dG).Poly(dC) / S. Majee, R.

Sen, S. Guha, D. Bhattacharyya, D. Dasgupta // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – Issue 8. – P.2291–2299.

76. Sedov, K. A. Olivomycin and related antibiotics. 23. Effect of olivomycins, chromomycins and mithramycin on leukemia La of mice of strain C57B1 / K. A. Sedov, I. B. Sorokina, Iu. A. Berlin, M. N. Kolosov // *Antibiotiki*. – 1969. – V. 14. – Issue 8. – P.721–725.

77. Menendez, N. Tailoring modification of deoxysugars during biosynthesis of the antitumour drug chromomycin A by *Streptomyces griseus* ssp. *griseus*. N. Menéndez, M. Nur-e-Alam, A. F. Braña, J. Rohr, J. A. Salas, C. Méndez // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 53. – Issue 3. – P.903–915.

78. Andreeva, E. V. Studies of complex formation of olivomycin A and its derivatives with DNA / E. V. Andreeva, A. M. Vinogradov, A. N. Tevyashova, E. N. Olsufyeva, T. V. Burova, N. V. Grinberg, V. Ya. Grinberg, S. G. Skuridin, M. N. Preobrazhenskaya, A. A. Shtil, V. A. Kuzmin // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2010. – V. 435: – P.334–338.

79. Langlois, R. G. Interactions between pairs of DNA-specific fluorescent stains bound to mammalian cells / R. G. Langlois, R. H. Jensen // *J. Histochem. Cytochem.* – 1979. – V. 27. – Issue 1. – P.72–79.

80. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions / G. Scatchard // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1949. – V. 51. – Issue 4. – P.660–672.

81. Banville, D.L. NMR studies of the interaction of chromomycin A₃ with small DNA duplexes. Binding to GC-containing sequences / D L. Banville, M. A. Keniry, M. Kam, R. H. Shafer // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – Issue 27. – P.6521–6534.

82. Tevyashova, A. N. Role of the acyl groups in carbohydrate chains in cytotoxic properties of olivomycin A / A. N. Tevyashova, N. A. Durandin, A. M. Vinogradov, V. B. Zbarsky, M. I. Reznikova, L. G. Dezhenkova, E. E. Bykov, E. N. Olsufyeva, V. A. Kuzmin, A. A. Shtil, M. N. Preobrazhenskaya // *J. Antibiot. (Tokyo)*. – 2013. – V. 66 – Issue 9. – P.523–530.

83. Брикенштейн, В. Х. Стереохимия и кинетика взаимодействия с ДНК противоопухолевого антибиотика оливомицина / В. Х. Бринкенштейн, Л. Р.

Питина, Г. М. Баренбойм, Г. В. Гурский // Мол. биология – 1984. – Т. 18. – Вып. 4. – С.1606–1616.

84. Berman, E. NMR studies of chromomycin A₃ interaction with DNA / E. Berman, S. C. Brown, T. L. James, R. H. Shafer // *Biochemistry*. – 1985. – V. 24. – Issue 24. – P.6887–6893.

85. Kam, M. Solution conformation of the antitumor antibiotic chromomycin A₃ determined by two-dimensional NMR spectroscopy / M. Kam, R.H. Shafer, E. Berman // *Biochemistry*. – 1988. – V. 27. – Issue 10. – P.3581–3588.

86. Drak, J. The carbohydrate domain of calicheamicin gamma II determines its sequence specificity for DNA cleavage / J. Drak, N. Iwasawa, S. Danishefsky, D. M. Crothers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – V. 88. – Issue 17. – P.7464–7468.

87. Zein, N. Calicheamicin gamma II and DNA: molecular recognition process responsible for site-specificity / N. Zein, M. Poncin, R. Nilakantan, G. A. Ellestad // *Science*. – 1989. – V. 244. – Issue 4905. – P.697–699.

88. Durandin, N. Inhibition of c-Myc transcription by olivomycin a involves preferential drug binding to NFAT/ Sp1 promoter site / N. Durandin, A. Vinogradov, A. Shtil, V. Kuzmin // *FEBS journal*. – 2013. – V. 280. – P.86–87.

89. Guo, J.X. Induced circular dichroism as a probe of handedness in chiral nematic polymer solutions / J.X. Guo, D.G. Gray // *Liquid Crystals*. – 1995. – V. 18. – Issue 4. – P.571–580.