

На правах рукописи



Дурандин Никита Александрович

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

Специальность 02.00.04 – физическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва-2014

Работа выполнена в лаборатории процессов фотосенсибилизации ФГБУН
Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: Владимир Александрович Кузьмин, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации ФГБУН Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля Российской академии наук.

Официальные оппоненты: Комиссаров Геннадий Германович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией фотобионики ФГБУН Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва
Олейников Владимир Александрович, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией молекулярной биофизики ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

Ведущая организация: ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва.

Защита состоится «15» октября 2014 г. в 13³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 в конференц-зале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, улица Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru/2014/>

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 002.039.01

кандидат химических наук



Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Оливомицины (производные оливомицина А) относятся к природным антибиотикам группы ауреоловой кислоты, широкое применение которых ограничено их высокой общерезорбтивной токсичностью. Изучение комплексообразования антибиотиков с мишенью и физико-химических параметров образующихся комплексов важно для направленного синтеза высокоэффективных и малотоксичных противоопухолевых препаратов с выраженной биологической (противоопухолевой, противомикробной) активностью и меньшей неспецифической токсичностью.

Важнейший современный подход при создании 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.

Взаимодействие лигандов с ДНК - развивающаяся в настоящее время область исследований. В отдельное и весьма разветвленное направление сформировались исследования по взаимодействию с ДНК различных низкомолекулярных лигандов (красителей, антибиотиков, коротких пептидов и других биологически активных соединений). Эти лиганды являются не только объектами самостоятельного изучения, но и нашли широкое применение в противоопухолевой и противовирусной терапии, а также в качестве ДНК-специфичных молекулярных зондов в медицинских и научных исследованиях.

Основная внутриклеточная мишень аналогов ауреоловой кислоты – двухцепочечная ДНК (дцДНК). С дцДНК производные ауреоловой кислоты прочно взаимодействуют в виде магний-координированного димера, состоящего из двух молекул антибиотика и одного атома магния. Нарушения структуры и функций ДНК в результате комплексообразования являются пусковым механизмом цитотоксичности аналогов ауреоловой кислоты. Таким образом, изучение констант комплексообразования для ряда аналогов оливомицина А с дцДНК и физико-химических характеристик их комплексов с дцДНК формируют 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 метастазирования и ангиогенеза. Сайт связывания Sp1 - транскрипционного фактора, взаимодействующего с GC-обогащенными сайтами в регуляторных областях

генов (в т.ч. онкогенов) - важная мишень анти-транскрипционного эффекта ауреоловой кислоты, так как антибиотик связывался с этим сайтом и снижал Sp1-зависимую транскрипцию. Производные ауреоловой кислоты селективно связываются с GC-парами в малой бороздке двойной спирали ДНК. 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. Одной из систем, моделирующих ДНК в условиях ее высокой компактизации, является холестерическая жидкокристаллическая дисперсия на основе дцДНК (хжкд-ДНК). Определение физико-химических параметров комплексообразования физиологически-активных соединений ДНК-направленного действия с хжкд-ДНК представляет особый интерес в силу того, что хжкд-ДНК может наилучшим образом отображать структуру ДНК в нативном состоянии (в структуре хроматина) и характер взаимодействия антибиотиков с ДНК в ядре.

Цель работы - изучение влияния структуры аналогов оливомицина А на их комплексообразование с дцДНК и определение физико-химических характеристик этих аналогов и образующихся комплексов.

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

- исследовать влияние *O*-ацильных заместителей А-олиозы и Е-оливомиказы 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 реакции комплексообразования оливомицина А и олигонуклеотида, несущего сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и 2-х аналогов с изменениями отдельных азотистых оснований. Методом кругового дихроизма установлено комплексообразование между оливомицином А и хжкд-ДНК. Экспериментально доказано, что накопление оливомицина А в структуре хжкд-ДНК приводит к переходу из холестерической формы дисперсии в нематическую.

Практическая значимость

Впервые полученные количественные данные (константы комплексообразования, 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 по комплексообразованию оливомицина А с олигонуклеотидом, несущим сайты связывания транскрипционных факторов Sp1 и NFAT, и его аналогами, позволили выявить высоко специфическую мишень действия оливомицина А. Впервые установлено комплексообразование оливомицина А в отсутствие ионов магния с высокоорганизованными структурами на основе дцДНК, а именно холестерической жидко-кристаллической дисперсией (хжкд-ДНК). Комплексообразование с хжкд-ДНК сопровождалось индуцированным переходом дисперсии из холестерической в нематическую форму. Полученные данные служат основой для создания новых и могут позволить улучшить уже существующие селективные мишень-направленные противоопухолевые препаратов на основе оливомицина А.

Апробация работы

Работа представлена на следующих научных конференциях: международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗЫ, Москва, Россия, (2011, 2012); конгресс «Anticancer Agents Research Congress», Antalya, Turkey (2011); 1-я конференция 1st International conference on Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks – Design and

Applications (FB3), Gothenburg, Sweden (2012); 4-я школа-конференция 4th Photochemistry Summer School 2012 «Photochemistry, Fundamentals and Applications», Wijk aan Zee, the Netherlands (2012); 38-й конгресс 38 FEBS Congress “Mechanisms in Biology”, Saint-Petersburg, Russia (2013).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в сборниках трудов конференций, 4 тезиса докладов на конференциях.

Структура и объем работы

Работа изложена на 102 страницах, включает 55 рисунков, 6 таблиц и список литературы. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, методической части, обсуждения результатов и выводов, списка литературы (89 источников).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были исследованы процессы комплексообразования лигандов с высокомолекулярной ДНК из спермы лосося (salmon Sperm DNA), состоящей из ~500 пар оснований («Sigma Aldrich», США); молекулярная масса ДНК $(0,3-0,7) \cdot 10^6$ Да. Для создания жидко-кристаллической дисперсии на основе ДНК применяли полиэтиленгликоль с молекулярной массой 4000 Да (Sigma Aldrich, США). Комплексообразование исследовано также для олигонуклеотидов $d(\text{TGGCGGGAAAAAG})_2$ (Sp1/NFAT), $d(\text{TGTAGGGAAAAAG})_2$ (Sp1/NFAT-m1), $d(\text{TGTAGGTA AAAAAG})_2$ (Sp1/NFAT-m2) («Литех», Москва). В экспериментах с «внешними» хромофорами использовались митоксантрон (Sigma Aldrich, США) и тиазоловый оранжевый (Sigma Aldrich, США). В качестве внутреннего стандарта для измерения квантового выхода использовали антибиотик из группы ауреоловой кислоты - хромомидин А₃ (Sigma Aldrich, США).

Концентрацию оснований ДНК определяли из коэффициента 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 лигандов были выбраны производные оливомицина А, полученные в в лаборатории химической трансформации антибиотиков Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (с.н.с. к.х.н. А.Н. Тевяшовой и др.) под руководством заведующего лабораторией, д.х.н., профессора М.Н. Преображенской:

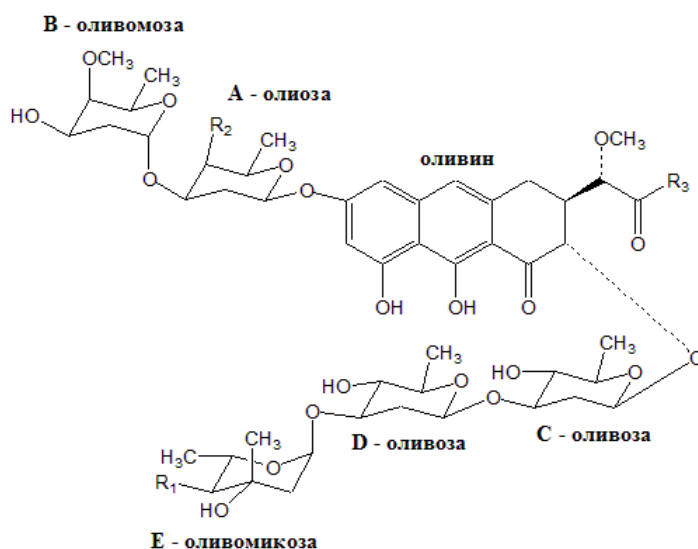


Рисунок 1. Структурные формулы оливомицина А и его аналогов.

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 качестве растворителя лигандов и ДНК 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 5×10^{-2} М.

Концентрации лигандов подбирались таким образом, чтобы оптическая плотность в экспериментах по поглощению не превышала 1 О.Е., что соответствует концентрации 10^{-5} - 10^{-4} М, и определялись по известным коэффициентам экстинкции в этиловом спирте.

В экспериментах по флуоресценции концентрация красителей была значительно меньше, порядка 10^{-7} - 10^{-6} М. Растворы красителей приготавливались в этиловом спирте и разбавлялись трис-НСl буфером. Все растворы были приготовлены непосредственно перед проведением эксперимента и оставлялись на 60 минут.

Измерения спектров поглощения проводились на спектрофотометре «Shimadzu UV-3101 РС» (Япония) в кварцевых кюветах 10×10 мм. Для получения спектров флуоресценции применяли спектрофлуориметр «Shimadzu RF-5301 РС» (Shimadzu,

Япония). 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, чтобы рассчитать равновесные константы комплексообразования.

Зависимость Скэтчарда: $\theta/[DNA] = 1/K_a - \theta/K_a$ (1)

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

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

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

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

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 лиганда, связанного с ДНК и свободного, соответственно.

Квантовый выход флуоресценции определяли методом сравнения со стандартом по уравнению:

$$\Phi_{fl\ образ} = \Phi_{fl\ станд} \times \frac{S_{fl\ образ} \times \epsilon_{станд} \times c_{станд} \times n_{образ}^2}{S_{fl\ станд} \times \epsilon_{образ} \times c_{образ} \times n_{станд}^2}, \text{ где}$$

$\Phi_{fl\ образ}$ – квантовый выход флуоресценции исследуемого образца, $\Phi_{fl\ станд}$ – квантовый выход флуоресценции стандарта, $S_{fl\ образ}$ – площадь спектра флуоресценции образца, $S_{fl\ станд}$ – площадь спектра флуоресценции стандарта, $\epsilon_{станд}$ – молярный коэффициент экстинкции стандарта, $\epsilon_{образ}$ – молярный коэффициент экстинкции образца, $n_{образ}$ – коэффициент преломления среды образца, $n_{станд}$ – коэффициент преломления среды стандарта, $c_{образ}$ – концентрация образца (в М), $c_{станд}$ – концентрация стандарта (в М)

Стандартом служил комплекс хромомидина A_3 с ДНК с известным квантовым выходом. Квантовые выходы флуоресценции лигандов в комплексах с ДНК определяли при высоких концентрациях ДНК, когда в буферных растворах лиганды присутствовали только в виде комплексов с ДНК.

Для определения типов образующихся комплексов антибиотиков с ДНК и олигонуклеотидами проводились измерения спектров кругового дихроизма (КД) на дихрометре СКД-2М (Троицк, Россия), оборудованным термостатируемой ячейкой.

Для того, чтобы детектировать кинетики взаимодействия оливомицина А с олигонуклеотидами в миллисекундном/секундном диапазоне, а также фиксировать промежуточные продукты на основе их флуоресцентных характеристик использовали установку остановленной струи SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания).

Обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro8 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

При помощи спектрофлуориметрического метода регистрировалось образование комплексов аналогов оливомицина А LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 с дцДНК. Образование комплексов А LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 с дцДНК регистрировали по увеличению интенсивности спектров флуоресценции на длине волны $\lambda_{em}=535$ нм при возбуждении $\lambda_{ex}=420$ нм (рис. 1 и рис. 2).

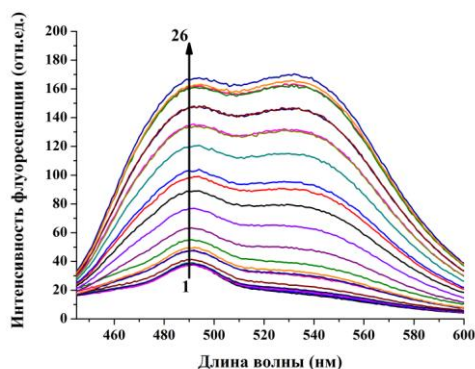


Рисунок 1. Спектры флуоресценции LСТА-254 (1×10^{-7} М) при увеличивающихся концентрациях дцДНК (от 0 М до $8,3 \times 10^{-4}$ М п.о.).

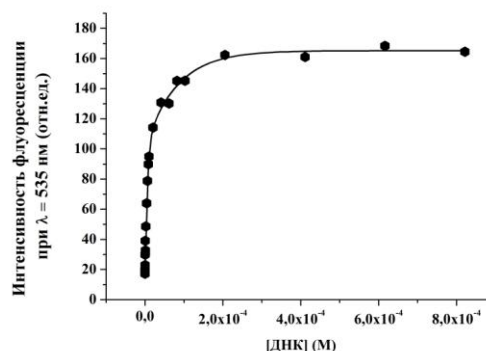


Рисунок 2. Зависимость интенсивности флуоресценции при 535 нм для LСТА-254 от концентрации дцДНК.

С использованием данных флуоресценции, константы комплексообразования (K_a) LСТА-255, LСТА-254, LСТА-1721, LСТА-1839, LСТА-1840 с дцДНК рассчитывали по методу Скэтчарда (рисунок 3 и рисунок 4).

Из-за слабого взаимодействия антибиотиков LСТА-1840 и LСТА-1839 с дцДНК и, как следствие, отсутствия характерной кривой насыщения, полученной для других антибиотиков, K_a для LСТА-1840 и LСТА-1839 с ДНК точно определить не представляется возможным. Оценочное значение K_a для LСТА-1840 и ДНК составляет $K_a \leq 2,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, а для LСТА-1839 и ДНК оно составляет $K_a \leq 1,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

K_a для LCTA-255, LCTA-254, LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840 с дцДНК, определенные по методу Скэтчарда, приведены в таблице 1.

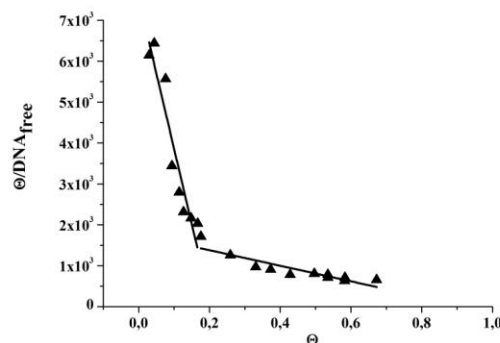
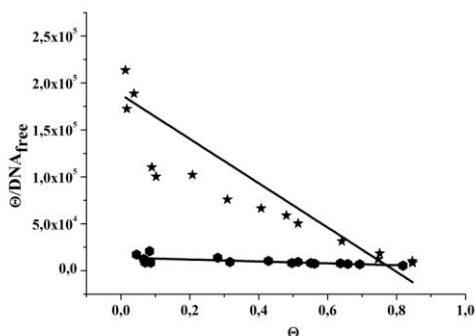


Рисунок 3. График Скэтчарда для LCTA-254 (звезды) и LCTA-1721 (шестиугольники) и дцДНК.

Рисунок 4. График Скэтчарда для LCTA-255 и дцДНК.

Соединение	K_a (M^{-1})
LCTA-254	$2,35 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$
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	$\leq 1,5 \times 10^2$

Таблица 1. Константы комплексообразования с дцДНК аналогов оливомицина А с ацильными заместителями в А-олиозе и Е-оливомикозе.

Исследование комплексообразования с ДНК аналогов оливомицина А с ацильными заместителями в составе А-олиозы и Е-оливомикозы (метод кругового дихроизма).

Для соединений LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721 наблюдалось значительное возрастание длинноволновой положительной полосы в спектре КД при их комплексообразовании с дцДНК (1 мМ) (рис. 5, рис. 6). Спектры КД комплексов антибиотиков LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721 с дцДНК свидетельствуют о том, что взаимодействие с дцДНК вызывает сходные изменения в структуре соединений и образуется один тип комплекса, а именно, комплекс по малой бороздке дцДНК. Длинноволновые максимумы КД в комплексах соединений LCTA-254, LCTA-255, LCTA-1721 совпадают, однако их амплитуды существенно различаются. Амплитуды длинноволновых полос в спектрах КД комплексов лигандов с дцДНК 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 дцДНК.

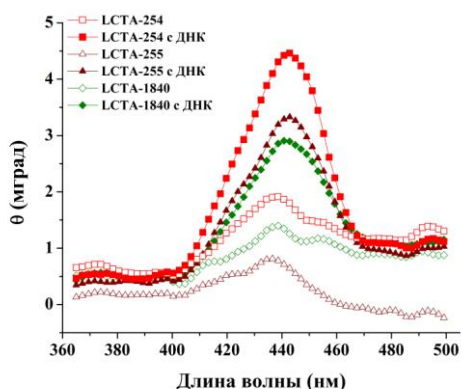


Рисунок 5. Спектры КД LCTA-254 (красные незаштрихованные квадраты), LCTA-255 (коричневые незаштрихованные треугольники) и LCTA-1840 (зеленые незаштрихованные ромбы) (1×10^{-5} М) и их комплексов с дцДНК (при [ДНК] = 1×10^{-3} М п.о.) (заштрихованные красные квадраты, коричневые треугольники и зеленые ромбы, соответственно).

Итак, более сильное взаимодействие лиганда со спиральной структурой дцДНК вызывает больший эффект наведенного КД.

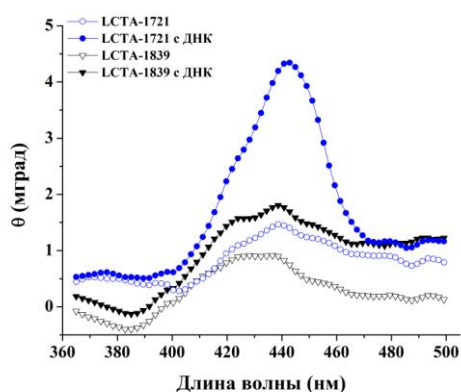


Рисунок 6. Спектры КД LCTA-1721 (незаштрихованные синие круги) и LCTA-1839 (незаштрихованные черные треугольники) (1×10^{-5} М) и их комплексов с дцДНК ([ДНК] = 1×10^{-3} М п.о.) (заштрихованные синие круги, черные треугольники, соответственно).

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

Для расчета значений квантовых выходов флуоресценции использовали метод сравнения со стандартом согласно уравнению, приведенному в главе «Материалы и методы исследования». В качестве внутреннего стандарта использовали хромомицин А₃ в комплексе с дцДНК с известным квантовым выходом.

Соединение	$\Phi_{\text{лиг}} (\%)$	$\Phi_{\text{компл}} (\%)$
LCTA-254	0,183	2,5
LCTA-255	0,122	1,76
LCTA-1721	0,146	2,26
LCTA-1840	0,1	1,17
LCTA-1839	0,07	0,3

Таблица 2. Квантовые выходы флуоресценции аналогов оливомицина А с ацильными заместителями в А- олиозе и Е- оливомиказе и их комплексов с дцДНК.

Данные, представленные в таблицах 1 и 2, свидетельствуют о том, что ацильные заместители в составе А-олиозы и Е-оливомиказы сильно влияют на квантовые выходы

флуоресценции LCTA-255, LCTA-254, LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840 и их комплексов с ДНК и определяют изменения констант комплексообразования этих лигандов с ДНК. Так, константа комплексообразования для LCTA-254 примерно в 5 раз выше, чем для LCTA-255 и в 20 раз выше по сравнению с LCTA-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 2-й и 3-й колонках таблицы 2, свидетельствуют о том, что заместители в составе А- олиозы и Е-оливомиказы в разной степени влияют на квантовые выходы флуоресценции лигандов в буферных растворах и в комплексах с ДНК. Это может быть обусловлено различием в микроокружении молекул лигандов в буферных растворах и в комплексе с ДНК. Взаимодействие лигандов с ДНК приводит к изменению квантовых выходов флуоресценции. Действительно, квантовые выходы флуоресценции, например, для LCTA-254 и LCTA-255 в комплексе с ДНК возрастают, соответственно, в 13,7 и 14,4 раз (таблица 2). При наличии сложноэфирных заместителей в R₂ (LCTA-254) возможно образование водородной связи между А-олиозой одной молекулы антибиотика и D-оливозой другой молекулы антибиотика в составе магниевого комплекса. Образование такой межмолекулярной водородной связи делает комплекс более компактным, придает жесткость структуре, в которой понижена подвижность заместителей. Поэтому квантовые выходы в этих соединениях должны быть выше, чем в соединениях, содержащих ОН-группу (LCTA-255), в которых такая внутримолекулярная водородная, по-видимому, связь не образуется. Структура LCTA-255 представляется более «рыхлой» по сравнению с LCTA-254. Действительно, LCTA-254 обладает более высокими квантовыми выходами флуоресценции, чем LCTA-255, и в комплексе с ДНК, и в буфере.

Значения квантовых выходов флуоресценции в ряду соединений LCTA-254, LCTA-255 в буферных растворах изменяется под влиянием внутримолекулярной водородной связи (LCTA-254). Поэтому более «рыхлая» структура LCTA-255 обуславливает меньшее, чем для LCTA-254, значение квантового выхода флуоресценции, как в буферном растворе, так и в комплексе с ДНК.

Структуры соединений LCTA-254, LCTA-255 различаются только заместителями в дисахаридной цепи, структура же трисахаридной цепи для этих соединений одинакова. Заместители в трисахаридной цепи обуславливают взаимодействие оливомицинов А с малой бороздкой двухцепочечной ДНК. Поэтому важно исследовать влияние структуры заместителей трисахаридной цепи на K_d LCTA-1721, LCTA-1839, LCTA-1840 с дцДНК. С этой целью были изучены соединения LCTA-1721, у которого ацетильный заместитель в положении R₁, LCTA-1839, у которого R₁ = R₂ = ОН, и LCTA-1840 с R₁ = ОН.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что LCTA-1721 характеризуется значением $K_a = 1 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$ М, которое по порядку величины сопоставимо со значением константы для LCTA-255. Оценочное значение K_a 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.

В таблице 2 представлены значения квантовых выходов флуоресценции для LCTA-1721, LCTA-1839 и LCTA-1840. Для LCTA-1721 значения квантовых выходов близки к LCTA-254, в то время как LCTA-1840 и LCTA-1839 характеризуются значительно более низкими значениями. Структура LCTA-1721 отличается от структуры LCTA-254 наличием ацетильного заместителя R_1 вместо изобутирильного в трисахаридном фрагменте. Как видно из сравнения LCTA-254 и LCTA-1721, замена изобутирильного заместителя на ацетильный приводит к снижению константы комплексообразования и квантовых выходов. Это может быть обусловлено изменением гидрофобного вклада при взаимодействии антибиотиков и ДНК: изобутирильный заместитель в LCTA-254 характеризуется большей гидрофобностью по сравнению с ацетильным в LCTA-1721. Еще более существенное снижение K_a и Φ_{fl} наблюдается при замене ацетильной группы на гидроксильную в этом же положении при сопоставлении LCTA-1721 и LCTA-1839 и LCTA-1840. Подтверждением этому служат результаты, полученные при замене ацетильного заместителя на гидроксильный в дисахаридной цепи в составе А-олиозы (LCTA-1840 и LCTA-1839), что вызывает столь резкое снижение K_a , что ее вычисление не представляется возможным: в LCTA-1839, помимо снижения гидрофобности трисахаридной ветви, отсутствует внутримолекулярная водородная связь. Также для LCTA-1839 зафиксированы самые низкие значения Φ_{fl} как лиганда в буфере, так и в составе комплекса с ДНК, в ряду исследованных аналогов оливомицина А.

Таким образом, соединения с двумя ацильными заместителями в сахаридных цепях - LCTA-254 и LCTA-1721 – характеризуются наибольшими K_a с ДНК ($2,35 \times 10^5$ М и 1×10^4 М, соответственно), $\Phi_{лиг}$ и $\Phi_{компл}$ и амплитудами индуцированного КД в комплексе с ДНК. Замена ацетильного заместителя в составе А-олиозы на гидроксильный (LCTA-255) приводит к уменьшению $\Phi_{лиг}$ и $\Phi_{компл}$, а также амплитуды индуцированного КД в присутствии с ДНК. 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 нарушают комплексообразование этих лигандов с ДНК ($K_a \leq 2,5 \times 10^2$ М и $K_a \leq 1,5 \times 10^2$ М, соответственно), существенно уменьшают $\Phi_{лиг}$ и $\Phi_{компл}$ и амплитуды индуцированного КД в комплексе с ДНК. Следовательно, замена

заместителей в дисахаридной и трисахаридной цепях антибиотика, позволяет варьировать физико-химические свойства соединений и их комплексов с ДНК в широких пределах.

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

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

Исходя из полученных зависимостей интенсивности флуоресценции (при $\lambda=530$ нм) от концентрации дцДНК (рисунок 7) определяли константы комплексообразования LCTA-1498 и LCTA-1599 с дцДНК по методу Скэтчарда (рисунок 8). Квантовые выходы флуоресценции комплексов LCTA-1599 и LCTA-1498 с дцДНК определяли методом сравнения со стандартом, как было сделано для LCTA-254. Полученные данные сведены в таблицу 3.

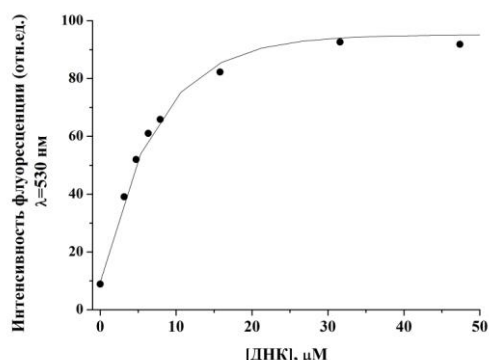


Рисунок 7. Зависимость интенсивности флуоресценции при 530 нм для LCTA-1599 от концентрации дцДНК.

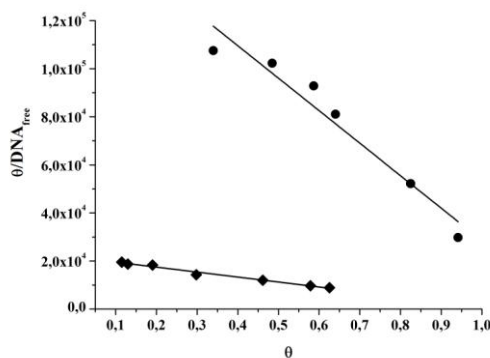


Рисунок 8. График Скэтчарда для LCTA-1498 (ромбы) и LCTA-1599 (круги) и дцДНК.

Соединение	K_a (M^{-1})	$\Phi_{\text{компл}}$ (%)
LCTA-1599	$1,35 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$	2,0
LCTA-1498	$2,1 \times 10^4 \pm 1,24 \times 10^3$	1,9

Таблица 3. Константы комплексообразования аналогов оливомицина А с карбоксильным и N,N-диметиламиноэтиламидным заместителями в боковой цепи агликона с дцДНК и квантовые выходы флуоресценции их комплексов с дцДНК.

Из данных таблицы 3 следует, что амидная группа в структуре LCTA-1599 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. Можно предположить, что резкое снижение K_a обусловлено наличием отрицательно заряженной при нейтральном pH карбоксильной группы, которая затрудняет комплексообразование антибиотика с ДНК, имеющей в своей структуре отрицательно заряженный сахарофосфатный остов, то есть электростатическим барьером. Важно отметить, что нивелирование отрицательно заряженной группы LCTA-1498 при переходе к амидной группе LCTA-1599 приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции в комплексе с ДНК (таблица 3). В отсутствие электростатического барьера LCTA-1599, по-видимому, более прочно закреплен в малой бороздке ДНК, что уменьшает количество степеней свободы молекулы антибиотика, замедляя безызлучательные процессы. В свою очередь, это увеличивает $\Phi_{\text{компл}}$ и K_a . Немаловажным представляется тот факт, что LCTA-1599 за счет амидной группы представляет собой более гидрофобную молекулу, чем LCTA-1498. Это позволяет лиганду LCTA-1599 образовать более прочный комплекс с ДНК, что подтверждает доминирующую энтропийную природу данного взаимодействия. Потеря гидрофобности при переходе от амидной группы к карбоксильной существенным образом сказывается на K_a , уменьшая ее в 6,4 раза.

При сравнении K_a LCTA-1599 и LCTA-1498 с LCTA-254 видно, что K_a для первого и последнего соединений в ряду отличаются менее, чем в 2 раза, в то время как для LCTA-1498 и LCTA-254 K_a различаются более, чем в 10 раз. Несмотря на более гидрофобную амидную группу LCTA-1599, K_a этого антибиотика с ДНК в 2 раза меньше по сравнению с K_a для LCTA-254. Важную роль при комплексообразовании играет стерический фактор, так как объемный N,N-диметиламиноэтиламидный заместитель затрудняет взаимодействие LCTA-1599 с малой бороздкой ДНК. Наличие отрицательно заряженной карбоксильной группы в LCTA-1498 и вовсе снижает K_a в 10 раз.

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что заместители в боковой цепи агликона играют важную роль в комплексообразовании с ДНК, а также влияют на $\Phi_{\text{компл}}$. Замена вицинальных гидроксильных групп LCTA-254 на карбоксильную группу в LCTA-1498 приводит к уменьшению K_a в 10 раз, в то время как амидирование карбоксильной группы на N,N-диметиламиноэтиламидную группу приводило к росту K_a в 6,4 раза.

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

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

Поглощение в области индуцированного КД в полосе LCTA-254 в присутствии олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 имеют положительный знак, что свидетельствует о комплексообразовании с олигонуклеотидами по малой бороздке. Поглощение в спектре индуцированного КД для комплекса LCTA-254 с олигонуклеотидом Sp1/NFAT в 3,5 раза выше по сравнению с амплитудой свободного лиганда. Поглощение КД комплексов LCTA-254 с олигонуклеотидами увеличиваются в ряду Sp1/NFAT-m2 < Sp1/NFAT-m1 < Sp1/NFAT при одинаковых условиях измерения (рисунок 9), что может говорить об увеличении взаимодействия между лигандом и спиральной структурой олигонуклеотида, т.к. более сильное взаимодействие между лигандом и мишенью вызывает больший сигнал индуцированного КД.

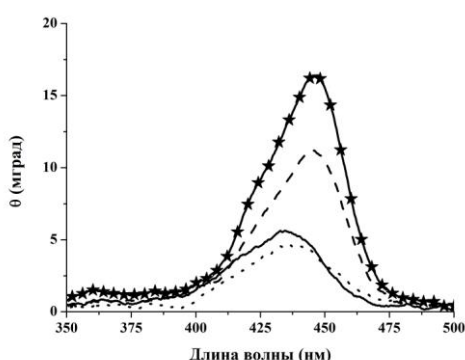


Рисунок 9. Спектры КД LCTA-254 (непрерывная линия) и комплексов LCTA-254 ($[LCTA-254]=1 \times 10^{-5}$ М) с олигонуклеотидами Sp1/NFAT ($[Sp1/NFAT]=2 \times 10^{-5}$ М) (черный со звездами), Sp1/NFAT-m1 ($[Sp1/NFAT-m1]=2 \times 10^{-5}$ М) (пунктир), Sp1/NFAT-m2 ($[Sp1/NFAT-m2]=2 \times 10^{-5}$ М) (точки)

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

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 10). Изменения интенсивности спектров флуоресценции LCTA-254 при последовательном увеличении концентрации Sp1/NFAT-m2 не наблюдалось.

Исходя из кривых насыщения, были рассчитаны концентрации свободного и связанного антибиотика. Эти данные были преобразованы в координатах Скэтчарда (рисунок 11) в соответствии с уравнением Скэтчарда:

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

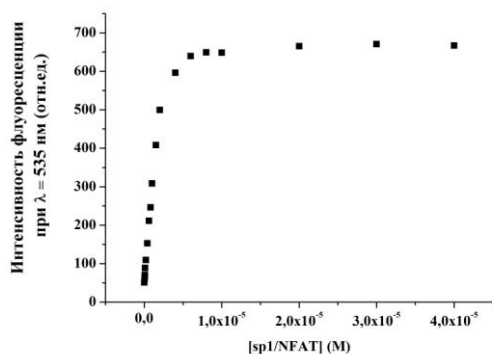


Рисунок 10. Зависимость интенсивности флуоресценции LCTA-254 (2 мкМ) ($\lambda_{em}=535$ nm) от концентрации олигонуклеотида Sp1/NFAT.

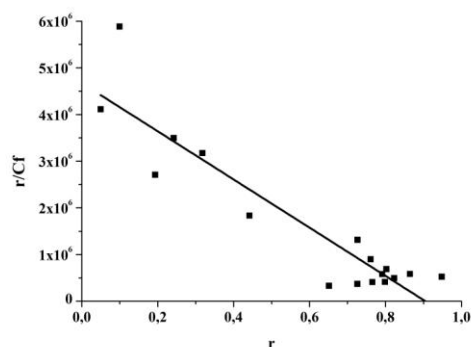


Рисунок 11. График Скэтчарда комплексообразования LCTA-254 и олигонуклеотида Sp1/NFAT.

Олигонуклеотиды Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 отличаются друг от друга последовательностью пар оснований. Sp1/NFAT является самым GC-насыщенным, в то время как у Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2 заменены отдельные G/C-основания на A/T, что сильно влияло на комплексообразование с LCTA-254. Исходя из данных стехиометрии, можно предположить, что в структуре олигонуклеотидов Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1 имеется только один сайт связывания LCTA-254. Для системы олигонуклеотида Sp1/NFAT-m2 и LCTA-254 K_a , как и стехиометрию, определить не удалось из-за слабого изменения спектров флуоресценции. Так, в ряду олигонуклеотидов Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1, Sp1/NFAT-m2 оливомицин А проявлял 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 ДНК (K_a оливомицина А с дцДНК спермы лосося составляла лишь $2,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Нарушение состава GC-насыщенного участка в Sp1/NFAT-m1 по сравнению с Sp1/NFAT привело к существенному снижению K_a ($\sim 7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), что почти на порядок меньше, чем для исходного олигонуклеотида Sp1/NFAT. Это согласуется с данными 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 A/T оснований вместо G/C, привело к еще более существенному снижению K_a , которую рассчитать не удалось. По оценочным данным она составляет $\leq 2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (таблица 4).

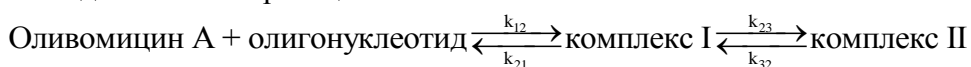
Олигонуклеотид	K_a (M^{-1})	n
Sp1/NFAT	$5,16 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^5$	$0,9 \pm 0,03$
Sp1/NFAT-m1	$7,5 \times 10^5 \pm 3 \times 10^5$	$0,94 \pm 0,165$
Sp1/NFAT-m2	$\leq 2,5 \times 10^4$	-

Таблица 4. Параметры комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1 и Sp1/NFAT-m2

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

Кинетика комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1 регистрировалась по возгоранию флуоресценции LCTA-254 (при $\lambda_{em} > 450$ и $\lambda_{ex} = 425$ нм) в миллисекундном/секундном диапазоне. Из рисунков 12 и 13 видно, что исследуемый процесс аппроксимируется двумя временами релаксации, изменяющимися от концентрации олигонуклеотида (на примере Sp1/NFAT).

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:

$$\text{для первой стадии: } \frac{1}{\tau_1} = \lambda_1 = k_{12} \cdot [\text{oligo}] + k_{21} \gg k_{23} + k_{32}, \quad K_{eq1} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$$

$$\text{для второй стадии: } \frac{1}{\tau_2} = \lambda_2 = k_{32} + k_{23} \frac{K_{eq1} \cdot [\text{oligo}]}{K_{eq1} \cdot [\text{oligo}] + 1}, \quad K_{eq2} = \frac{k_{23}}{k_{32}}$$

В соответствии с серией уравнений зависимость обратного времени релаксации первой стадии процесса λ_1 представляет собой прямую. На рисунках 14 и 15 показана экспериментальная и аппроксимированная, исходя из серии уравнений, зависимость λ_1 и λ_2 от концентрации олигонуклеотида Sp1/NFAT. Константу комплексообразования рассчитывали с использованием уравнения:

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

Значения констант скоростей реакций и равновесных констант комплексообразования приведены в таблице 5.

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

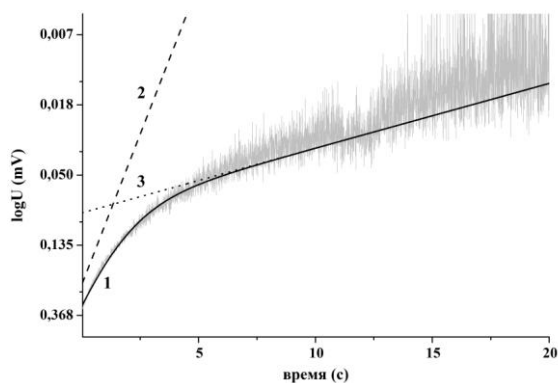


Рисунок 12. Представление кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции в логарифмическом масштабе ($\log U$) комплекса оливомицина А (2 мкМ) с ионами магния (50 мМ) при связывании с олигонуклеотидом Sp1/NFAT (20 мкМ) в виде суммы двух экспонент $U(t)=A_1e^{-\lambda_1 t}+A_2e^{-\lambda_2 t}$: 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)

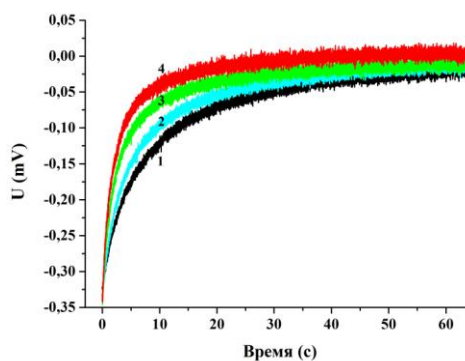


Рисунок 13. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции (U) комплекса оливомицина А (1 мкМ) с ионами магния (50 мМ) при связывании с олигонуклеотидом Sp1/NFAT (1: 4 мкМ, 2: 5 мкМ, 3: 10 мкМ, 4: 20 мкМ).

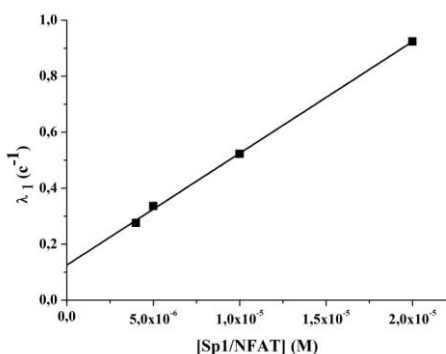


Рисунок 14. Зависимость обратного времени релаксации 1-й стадии λ_1 процесса комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT в зависимости от концентрации Sp1/NFAT.

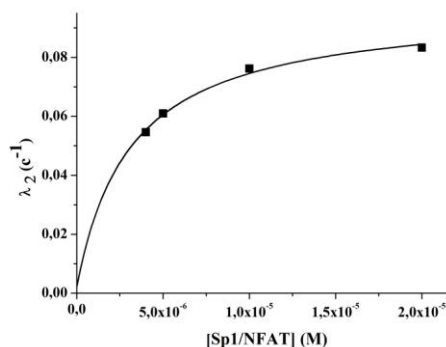


Рисунок 15. Зависимость обратного времени релаксации 2-й стадии λ_2 процесса комплексообразования оливомицина А с Sp1/NFAT в зависимости от концентрации Sp1/NFAT.

Таблица 5. Кинетические параметры комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT и Sp1/NFAT-m1.

	$k_{12},$ $M^{-1}c^{-1}$	$k_{21},$ 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	$1,2 \times 10^5$

Анализ кинетических кривых позволяет сделать вывод о том, что механизм комплексообразования оливомицина А с олигонуклеотидами Sp1/NFAT, Sp1/NFAT-m1 хорошо аппроксимируется моделью двух последовательных реакций: одной быстрой и второй - более медленной. Модель рассматривает образование промежуточного комплекса (комплекс I) на первой стадии процесса с последующей его перестройкой в более стабильный комплекс (комплекс II) на второй стадии. Каждая стадия зависит от состава олигонуклеотида. В связи с этим, первая стадия, вероятно, характеризует взаимодействие сахарных цепей антибиотика с основаниями олигонуклеотидов, а вторая, более медленная – встраивание хромофора антибиотика в узкую бороздку олигонуклеотидов. Константы скоростей реакций оливомицина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT в среднем на порядок выше таковых для Sp1/NFAT-m1, что подтверждает данные о высокой специфичности данного взаимодействия. Константы равновесия, полученные на основе кинетических данных, согласуются с константами, полученными методом флуоресцентного титрования, что свидетельствует, по-видимому, в пользу предложенной кинетической модели.

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

Исследование изменения структуры холестерической жидкокристаллической дисперсии на основе дцДНК под действием оливомицина А методом кругового дихроизма

Важно отметить, что полоса КД при длине волны около 270 нм для ДНК, конденсированной в холестерическую форму, может быть на несколько порядков более интенсивной (psi-полоса), нежели для линейной дцДНК, что делает данную систему крайне привлекательной для изучения методом КД.

Как показано на рисунках 16 и 17, при увеличении концентрации оливомицина А изменяется интенсивность psi-полосы хжкд-ДНК, в то время как в диапазоне длин волн поглощения ЛСТА-254 появились две полосы отрицательного и положительного знаков при 380 нм и 425 нм, соответственно.

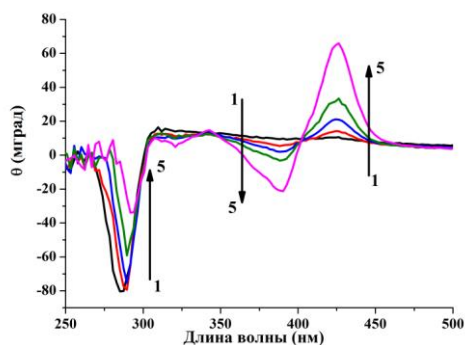


Рисунок 16. Спектры КД хжкд-ДНК 3×10^{-5} М п.о. при увеличивающихся концентрациях оливомицина А: 1 (черный) – 0 М; 2 (красный) – $1,6 \times 10^{-5}$ М; 3 (синий) – $2,4 \times 10^{-5}$ М; 4 (зеленый) – $4,8 \times 10^{-5}$ М; 5 (фиолетовый) – $1,04 \times 10^{-4}$ М.

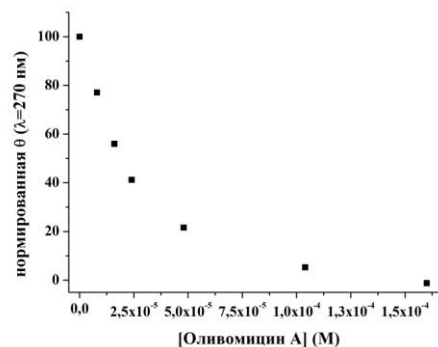


Рисунок 17. Зависимость нормализованной амплитуды спектров КД ($\lambda=270$ нм) хжкд-ДНК 3×10^{-5} М п.о. от концентрации добавленного оливомицина А.

При достижении концентрации $1,6 \times 10^{-4}$ М антибиотика аномальная полоса дальнего порядка хжкд-ДНК практически исчезает (рисунок 17), что может говорить о переходе холестерической упаковки жидко-кристаллической структуры в нематическую.

Эффект был подробно изучен с применением известного интеркалятора тиазолового оранжевого (ТО) (метод «внешнего» хромофора). Интеркалятор ТО использован в качестве метки для мониторинга состояния высокоорганизованной структуры на основе ДНК. Изменение амплитуды полосы при $\lambda=270$ нм, связанной с поглощением азотистых оснований ДНК, и при $\lambda=510$ нм, характерной для индуцированного КД ТО, в зависимости от концентрации оливомицина А представлены на рисунках 19 и 20. Важно отметить схожий характер концентрационных зависимостей амплитуд спектров КД при обеих длинах волн. Аномальная рsi-полоса хжкд-ДНК на длине волны азотистых оснований практически полностью исчезает при концентрации оливомицина А, равной 1×10^{-4} М. В то же время при увеличении концентрации антибиотика резко сокращается амплитуда спектров индуцированного КД контрольной молекулы ТО, что подтверждает эффект изменения структуры хжкд-ДНК.

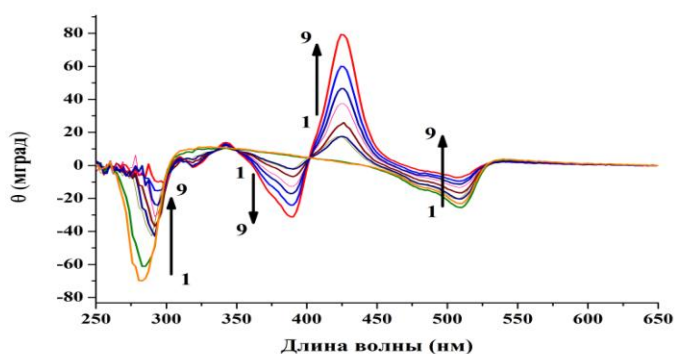


Рисунок 18. Спектры КД комплекса ТО $1,5 \times 10^{-5}$ с хжкд-ДНК 3×10^{-5} М п.о. при увеличивающихся концентрациях оливомицина А (от 0 до 1×10^{-4} М).

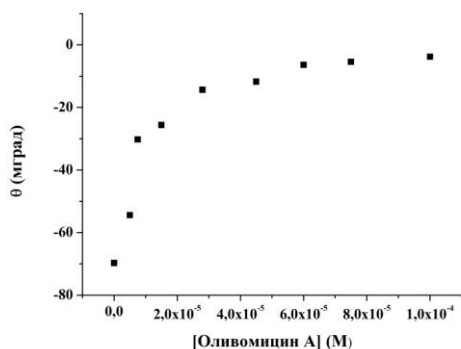


Рисунок 19. Зависимость значения амплитуд спектров КД комплекса красителя ТО $1,5 \times 10^{-5}$ М с хжкд-ДНК 3×10^{-5} М п.о. на длине волны хжкд-ДНК 270 нм от концентрации оливомицина А.

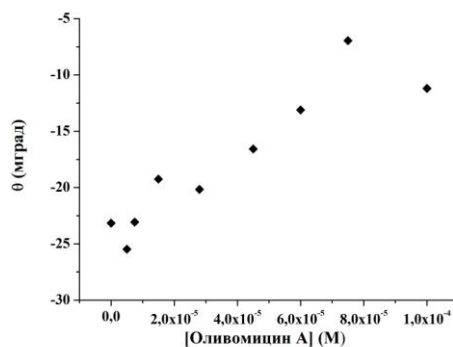


Рисунок 20. Зависимость значения амплитуд спектров КД комплекса красителя ТО $1,5 \times 10^{-5}$ М с хжкд-ДНК 3×10^{-5} М п.о. на длине волны красителя ТО 510 нм от концентрации оливомицина А.

Данные, полученные методом КД, указывают на комплексообразование оливомицина А с хжкд-ДНК. По-видимому, взаимодействие оливомицина А со сверхконденсированной ДНК приводит лишь к нематизации слоев в структуре хжкд-ДНК, но не нарушает или слабо дезорганизует вторичную структуру ДНК в составе квазинематических слоёв. Это предположение также подтверждается тем фактом, что в диапазоне концентраций оливомицина А, при которых ρ si-полоса хжкд-ДНК почти не проявлялась, амплитуда полосы индуцированного КД ТО сравнима с амплитудой индуцированного КД комплекса ТО с дцДНК.

В соответствии с теорией, 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 коротком расстоянии друг от друга, заряженные группы молекул, 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, холестерический жидкий кристалл в нематический, а затем нематический жидкий кристалл в холестерический, 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 обеспечения малых расстояний 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.

ВЫВОДЫ

1. Оливомоцилин 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. Оливомоцилин 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 оливомоцилина А с модифицированными олигонуклеотидами.
4. Установлен кинетический механизм взаимодействия оливомоцилина А с олигонуклеотидом Sp1/NFAT и его модифицированными аналогами. Согласно предложенной модели процесс комплексообразования оливомоцилина 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 оливомоцилина А с холестерической жидкокристаллической дисперсией на основе ДНК приводит к нарушению холестерической структуры дисперсии, связанному с переходом дисперсии из холестерической формы в нематическую.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. 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.
 3. 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.
 4. Durandin, N. On The Road To Olivomycin A-based Antitumor Therapeutics: A Novel Modification Of The Aglycone Side Chain / N. Durandin, A. Tevyashova, A. Vinogradov, E. Olsufieva, V. Bukhman, A. Shtil, M. Preobrazhenskaya, V. Kuzmin // *Book of abstracts of «Anticancer Agents Research Congress», Antalya, 2011.* - С. 112
 5. Штиль А. А. Разработка противоопухолевых препаратов нового поколения на основе аналогов ауреоловой кислоты и исследование физико-химических свойств их комплексов с ДНК / А. А. Штиль, А. Н. Тевяшова, Н. А. Дурандин, А. М. Виноградов, Е. Н. Олсуфьева, М. Н. Преображенская, В. А. Кузьмин // *Сборник тезисов докладов на конференциях и семинарах по научным направлениям Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Москва.* – М.: «Слово», 2011. - С. 113-115
 6. Дурандин Н. А. Противоопухолевая терапия на основе Оливомицина А: Новая модификация боковой цепи агликона / Н. А. Дурандин, А. Н. Тевяшова, А. М. Виноградов, Е. Н. Олсуфьева, В. М. Бухман, А. А. Штиль, М. Н. Преображенская, В. А. Кузьмин // *Сборник научных трудов XI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ, ИБХФ, Москва.* – М.: РУДН, 2012. - С. 126-127
 7. Durandin N. A role of acyl substituents in drug:DNA complex formation and antitumor properties of novel olivomycin A derivatives / N. Durandin, A. Vinogradov, A. Tevyashova, E. Olsufyeva, E. Bykov, L. Dezhenkova, A. Shtil, M. Preobrazhenskaya, V. Kuzmin // *Book of abstracts of 1st International conference on Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks – Design and Applications (FB3).* - Gothenburg: Chalmers University of Technology, 2012. – P. 93
 8. Durandin N. DNA complex formation of Olivomycin A derivatives and furodihydroquinolines: Drug-DNA Binding for Medicinal Therapies / N. Durandin,

A. Vinogradov, O. Lygo, A. Tevyashova, E. Khodot, A. Shtil, M. Preobrazhenskaya, T. Nekipelova, V. Kuzmin // Book of abstracts of 4th Photochemistry Summer School 2012 on «Photochemistry, Fundamentals and Applications» (Wijk aan Zee). – Amsterdam:University of Amsterdam, 2012. – P. 47

9. Durandin N. A. Role of the acyl groups in carbohydrate chains in biological properties of olivomycin A and its analogs / Durandin N. A., Tevyashova A. N., Vinogradov A. M., Olsufyeva E. N., Shtil A. A., Preobrazhenskaya M. N., Kuzmin V. A. // Сборник научных трудов XII Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ, ИБХФ, Москва. – М.: РУДН, 2012. - С. 54-58