

УДК 577.3

## ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АКТИНОЦИНА С ДНК

### 10. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА АКТИНОЦИЛ-БИС-(3-ДИМЕТИЛАМИНОПРОПИЛ)АМИНА – ДВУСПИРАЛЬНАЯ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВАЯ КИСЛОТА ПО ДАННЫМ РАМАН СПЕКТРОСКОПИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Ю.Н. Близнюк, Т.В. Больбух, Е.Б. Круглова, М.А. Семёнов, В.Я. Малеев

*Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 61085, Харьков.*

Статья поступила в редакцию 1 апреля 2005 г.

Методами спектрофотометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман спектроскопии) проведено исследование комплексообразования в водных растворах производного актиноцина актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амина (ActIII) с двуспиральной структурой полирибозитидиловой кислоты poly(C)·poly(C<sup>+</sup>). Численный анализ спектрофотометрических концентрационных зависимостей позволил установить интервалы P/D (P – моли фосфата, D – моли лиганда), в которых преобладают комплексы с разными типами связывания лигандов (мономерно связанный и агрегированный) с двуспиральной структурой poly(C). На основе полученных Раман спектров комплексов ActIII–poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) определены группы атомов лиганда ActIII, участвующих в образовании комплексов с полинуклеотидной матрицей по типу внешнего связывания.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** Раман спектроскопия, спектрофотометрия, производное актиноцина ActIII, полирибозитидиловая кислота poly(C)·poly(C<sup>+</sup>), двуспиральная структура, комплексообразование, агрегаты.

Изучение комплексообразования производных актиноцина с матрицами полирибозитидиловой кислоты связано с тем, что гомополинуклеотидные цепочки разной длины и структуры функционируют в клетках. Ранее в работе [1] было показано, что феноксазоновые кольца лиганда актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амина (в дальнейшем будем называть его ActIII) не интеркалируют в стопку цитозинов односпиральной полирибозитидиловой кислоты, как это имеет место в ДНК [2], а взаимодействуют с ней по типу внешнего связывания. В этой же работе с помощью ИК-спектроскопии влажных плёнок комплекса ActIII–poly(C) было установлено, что ActIII связывается с кислородами фосфатов одно- и двуспиральной конформаций полинуклеотида. Однако, если в работе [3] показано, что атомные группы C–NH<sub>2</sub> и C=O ActIII связываются с сахарофосфатным остовом и, возможно, с NH<sub>2</sub>-группами цитозина односпиральной структуры poly(C), то до настоящего времени неизвестно, какие группы атомов лиганда участвуют в комплексообразовании с двуспиральной структурой poly(C)·poly(C<sup>+</sup>). Получить ответы на эти вопросы можно с помощью Раман спектроскопии, которая в отличие от метода ИК-спектроскопии имеет ряд преимуществ. Во-первых, колебательные Раман спектры могут быть получены в разбавленных водных растворах, т.е. при концентрациях лиганда, которые обычно используются при исследованиях их спектров поглощения [1]. Поэтому результаты Раман спектроскопии могут быть сопоставлены с результатами спектрофотометрии в УФ и видимой области. Во-вторых, можно получить Раман спектры производных актиноцина в составе комплексов при низких концентрациях нуклеиновых кислот (~10<sup>-5</sup>÷10<sup>-3</sup> М/л). При частоте возбуждающего лазерного излучения (λ=488 нм) близкой к частоте характеристической полосы поглощения лиганда, как показано в работе [2], нуклеиновая кислота практически не вносит вклад в спектр КР феноксазонового хромофора. В настоящей работе методами Раман спектроскопии и спектрофотометрии в широком интервале P/D проведено исследование комплексообразования актиноцинового производного ActIII с двуспиральной структурой poly(C), определены атомные группы, участвующие в образовании разных типов комплексов, и соответствующие константы связывания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе использовали калиевую соль полирибозитидиловой кислоты poly(C) фирмы "Reanal" (Венгрия). Количество ионов калия в образцах контролировали с помощью пламенного фотометра ФПЛ-1. В исследуемом препарате на один фосфат приходился один ион калия.

Спектральные характеристики препарата ActIII (M=568 Да) приведены в работе [4]. Структурная формула и нумерация атомов лиганда ActIII показаны на рис.1. Приготовление комплексов подробно описано ранее [1].

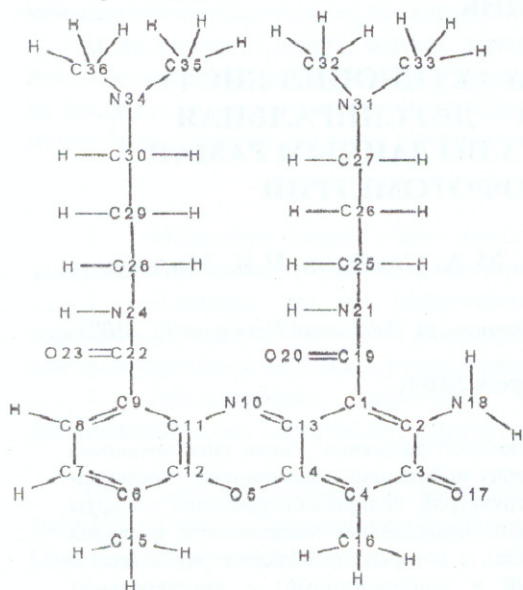


Рис. 1. Структурная формула актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амина (ActIII).

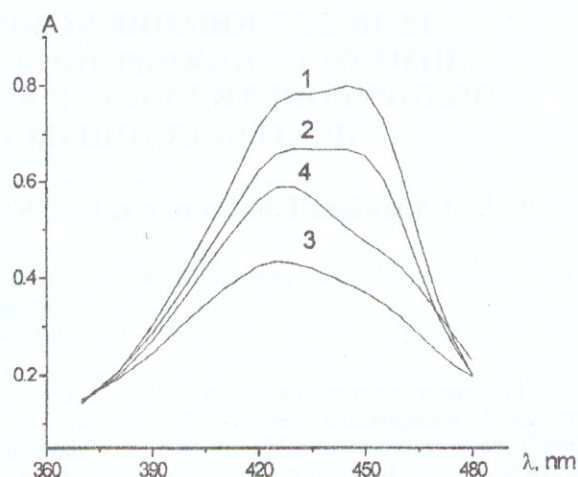


Рис. 2. Спектры поглощения смесей poly(C)·poly(C<sup>+</sup>)-ActIII в ацетатном буферном растворе (pH 4,45) при разных значениях P/D: P/D=0 (1); P/D=1,3 (2); P/D=4,2 (3); P/D=46,9 (4); C<sub>ActIII</sub>=2,64×10<sup>-5</sup> М.

Спектрофотометрическое титрование было проведено в ацетатном буферном растворе (pH 4,45, 9×10<sup>-3</sup> М CH<sub>3</sub>COOH, 5×10<sup>-3</sup> М CH<sub>3</sub>COONa). Спектры поглощения измерялись на спектрофотометре Specord M40 в кварцевых кюветках с толщиной 1 см. Для численного анализа полученных спектральных концентрационных зависимостей и определения термодинамических параметров связывания (констант и величин мест связывания) была использована программа оптимизации, детально описанная в [5].

Спектры КР лиганда ActIII и его комплексов с poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) были получены в спектральной области 1200–1700 см<sup>-1</sup> с помощью Раман спектрометра DILOR Z-16 (Франция) с двойным монохроматором. Градуировка монохроматора спектрометра производилась по частотам спектра CCl<sub>4</sub>. В работе источником возбуждающего света служил аргоновый лазер фирмы Innova-70 (Англия) с λ<sub>возбужд.</sub> = 488 нм и 457,9 нм, которые расположены вблизи максимума полосы собственного электронного поглощения лиганда ActIII (рис. 2). Для получения Раман спектров использовалась в основном линия возбуждения лазера с длиной волны 488 нм.

Растворы ActIII и его смесей с poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) в области P/D=0÷132 помещали в квадратные кварцевые кюветы длиной 10 мм и герметизировали. Спектры КР записывали при температуре 20°C. Для предотвращения фоторазрушения образцов использовалась мощность лазерного излучения не более 50 мВт [6]. Спектральная ширина щели составляла от 3 до 4 см<sup>-1</sup>, скорость сканирования 50 см<sup>-1</sup> в минуту.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## Спектрофотометрические измерения

Как следует из рис. 2, при добавлении полирибозитидиловой кислоты к растворам лиганда ActIII в спектрах поглощения в видимой области происходят существенные изменения. В области низких значений P/D (0<P/D≤4) с ростом концентрации poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) наблюдается падение поглощения практически во всем интервале рассмотренных длин волн (рис.2, спектры 2 и 3), а затем (при P/D>4) происходит медленное увеличение поглощения смесей с максимумом полосы в λ = 430 нм (рис.2, спектр 4) [2]. Концентрационные изменения поглощения смесей poly(C)·poly(C<sup>+</sup>)-ActIII в λ=430 нм

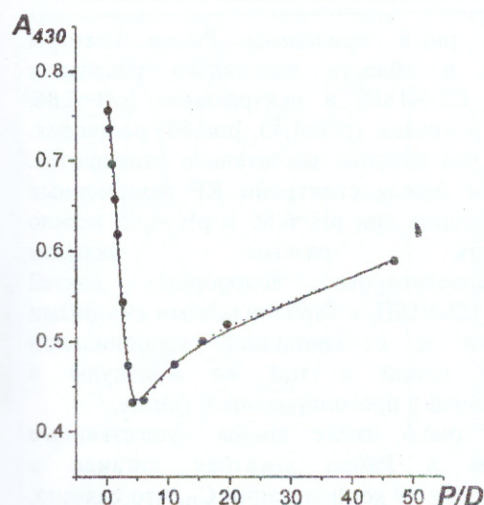


Рис. 3. Зависимости поглощений смесей ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) в  $\lambda=430$  нм от P/D (экспериментальная (—) и расчетная (---•)). Расчет проводился по программе оптимизации [5] при значениях константы комплексообразования  $K=1.13 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup>, фактора кооперативности  $\omega=15$ , величина места связывания  $n=4.0$ ;  $C_{a,III}=2.5 \cdot 10^{-5}$  М.

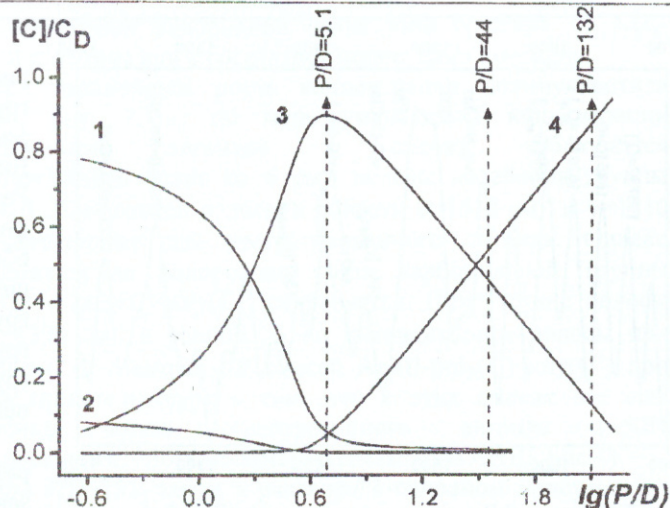


Рис. 4. Расчетные P/D-зависимости относительных концентраций ActIII для разных типов связывания лиганда с двухцепочечной poly(C)-poly(C<sup>+</sup>): 1 – свободных мономеров; 2 – свободных димеров; 3 и 4 – агрегированного и мономерно связанного ActIII. Расчет проводился при значении параметров, приведенных на рис.3. [C] – равновесная концентрация разных типов комплексов, C<sub>D</sub> – общая концентрация лиганда.

проиллюстрированы на рис.3. Наблюдаемые изменения в области до  $P/D \leq 4$  можно объяснить уменьшением количества свободного лиганда в смесях и одновременным увеличением концентрации ActIII, связанного с матрицей poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) в виде агрегатов. При дальнейшем росте концентрации poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) возрастает количество мономерно связанного лиганда, что приводит к росту поглощения в той же области длин волн [3].

Как видно из рис. 2, спектры поглощения агрегированных и мономерно связанных ActIII различаются. С помощью разработанной нами программы оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей DALSMOD [5, 7] были определены оптимальные значения параметров комплексообразования в системе ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>): константа мономерного связывания  $K=1,13 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup>, величина места связывания  $n=4 \pm 0,1$  и фактор кооперативности  $\omega=15 \pm 3$ . Используя полученные величины параметров, мы рассчитали относительные концентрации разных типов комплексов и свободного лиганда (в мономерном и димерном состояниях) в смесях ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) в зависимости от P/D (рис.4). Хорошо видно, что с ростом концентрации полинуклеотида доля свободных мономеров и димеров ActIII в смесях быстро убывает (кривые 1 и 2, рис.4). Концентрация агрегированных лигандов в смесях (кривая 3, рис.4) максимальна в области  $P/D \approx 4-5$ . Концентрация мономерно связанных лигандов, начиная с  $P/D \approx 4-5$ , постепенно возрастает. Необходимо отметить, что доля агрегированных лигандов в смесях ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) достаточно велика даже при очень больших значениях P/D.

### Спектры комбинационного рассеяния света комплексов ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>)

Для того чтобы определить группы атомов ActIII, участвующих в образовании разных типов комплексов на матрице двуспиральной полирибонитидиловой кислоты, были получены Раман спектры смесей poly(C)-poly(C<sup>+</sup>)-ActIII в рассмотренной области P/D (рис. 4).

На рис.5 представлен обзорный спектр КР в области  $1200-1700$  см<sup>-1</sup> лиганда ActIII в буферном растворе с концентрацией, при которой его димеризация практически отсутствует. Видно, что спектр довольно сложный и в настоящее время отсутствует его надежная расшифровка. Учитывая характеристичность колебаний, результаты работы [8] по расшифровке колебаний феноксазонового хромофора актиномицина D, а также проведенные в последнее время расчеты нормальных колебаний хромофора [10], мы провели отнесение полос колебания в отдельных спектральных областях, связанных с карбонильными колебаниями и валентными колебаниями группы C-N и C=C-групп атомов. Анализ комплексообразования в системе ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>), как и в случае ActIII-poly(C) [3], был проведен в спектральных областях валентного колебания группы C2-N18H<sub>2</sub> ( $1390-1430$  см<sup>-1</sup>) и колебаний карбонильных групп лиганда ( $1610-1680$  см<sup>-1</sup>) [8].

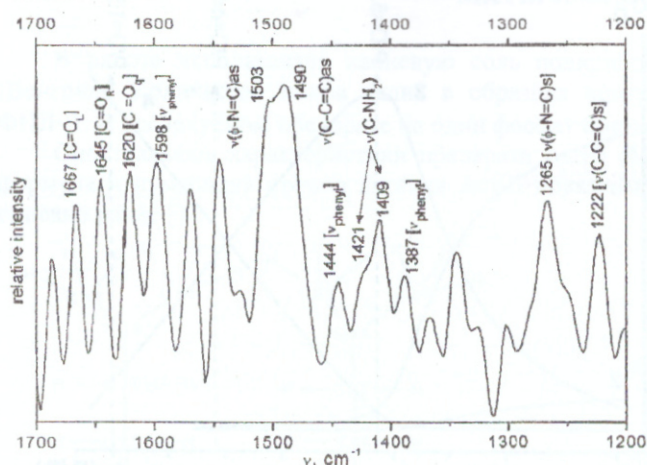


Рис. 5. Обзорный Раман спектр лиганда ActIII в буферном растворе при pH=4,45;  $C_D=6,85 \times 10^{-5}$  М.

результатами спектрофотометрических исследований растворов актиноциновых производных [9]. При низких концентрациях лиганда, когда ActIII находится преимущественно в мономерной форме, при pH=6,86 наблюдается широкая компонента с максимумом при  $\nu=1420$  см<sup>-1</sup>. С ростом концентрации лиганда, когда происходит его димеризация, появляется компонента с максимумом при  $\nu=1398$  см<sup>-1</sup>. В кислой области (рис. 6, б) при димеризации также наблюдается компонента с  $\nu=1396$  см<sup>-1</sup>. Однако для мономерной формы ActIII при pH=4,45 характерна интенсивная полоса с максимумом при  $\nu=1409$  см<sup>-1</sup> (в отличие от полосы при  $\nu=1420$  см<sup>-1</sup> при нейтральном pH), что мы объясняем протонированием концевых аминогрупп и образованием двухкатионного ActIII<sup>2+</sup>. Появление низкочастотной компоненты с  $\nu \leq 1400$  см<sup>-1</sup> в спектрах КР свободного лиганда при больших  $C_D$  мы связываем с образованием межмолекулярных водородных связей группы C2-N18H<sub>2</sub> с карбонильными атомами соседних молекул.

Известно, что полосы колебания amino- и карбонильных групп весьма чувствительны к образованию внутри- и межмолекулярных водородных связей. Поэтому анализ связывания ActIII с полимером мы проводили одновременно в двух спектральных областях: в области карбонильных колебаний и колебаний группы C2-N18H<sub>2</sub>. Согласно данным работы [10], полосы при 1620 см<sup>-1</sup>, 1645 см<sup>-1</sup> и 1667 см<sup>-1</sup> следует отнести к колебаниям хиноидного карбонила феноксазонового кольца C3=O17 и амидным карбонильным группам C19=O20 и C22=O23, соответственно.

На рис. 7 приведены Раман спектры комплексов ActIII-poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) при pH=4,45 в области колебаний карбонильных и C2-N18H<sub>2</sub> атомных групп в зависимости от P/D. Как следует из рис. 4 (кривая 3), при P/D≈5,7 ActIII связывается с poly(C)-poly(C<sup>+</sup>) в основном в виде агрегатов, о чем свидетельствует появление широкой полосы при  $\nu=1398$  см<sup>-1</sup> (рис. 7, б), как при димеризации. При этом полосы колебания карбонильных групп C19=O20 и C22=O23 претерпевают низкочастотные сдвиги на  $\Delta\nu=9 \pm 10$  см<sup>-1</sup> относительно спектра КР свободного лиганда, а полоса колебания хиноидного карбонила, по-видимому, высокочастотный сдвиг. Поэтому в спектре КР при P/D=5,7 появляется сложная полоса при  $\nu=1635$  см<sup>-1</sup>. Низкочастотные сдвиги карбонильных колебаний указывают на то, что карбонилы образуют межмолекулярные водородные связи, а высокочастотный сдвиг частоты колебания хиноидного карбонила связан либо с резонансным взаимодействием карбонильных колебаний, либо с разрывом внутримолекулярной водородной связи с C2-N18H<sub>2</sub>-группой. Низкочастотное смещение полосы колебания группы C22=O23 на  $\Delta\nu=9$  см<sup>-1</sup> до значения  $\nu=1658$  см<sup>-1</sup> возможно возникает при образовании

На рис.6 приведены Раман спектры лиганда в области валентного колебания группы C2-N18H<sub>2</sub> в нейтральном (pH=6,86, рис.6а) и кислом (pH=4,45, рис.6б) растворах. Видно, что спектры значительно отличаются. Различия между спектрами КР мономерных форм лиганда при pH=6,86 и pH=4,45 можно объяснить разным вкладом внутримолекулярных водородных связей группы C2-N18H<sub>2</sub> с карбонильными амидными группами и с хиноидной карбонильной группой одной и той же молекулы в нейтральной и протонированной форме.

Из рис.6 также видны существенные различия в Раман спектрах лиганда в зависимости от концентрации  $C_D$ , что связано, по-видимому, с появлением свободных димеров. Этот вывод согласуется с

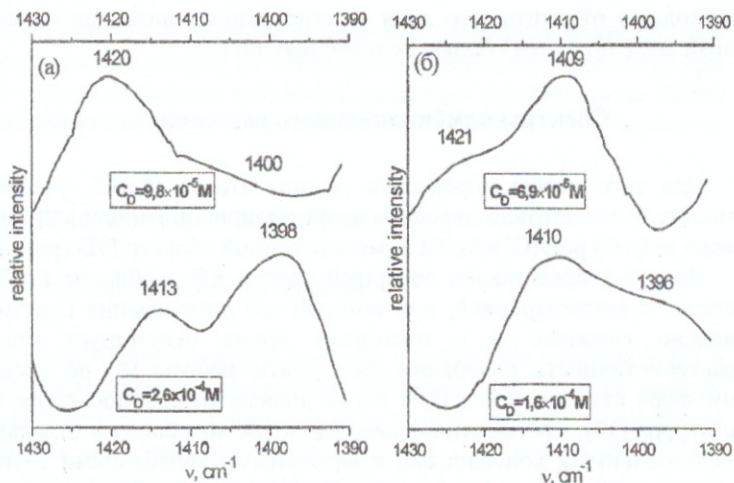


Рис. 6. Раман спектры ActIII в области колебаний C2-N18H<sub>2</sub>-группы в нейтральном (а) (pH=6,86) и кислом (б) (pH=4,45) растворах для разных концентраций лиганда.

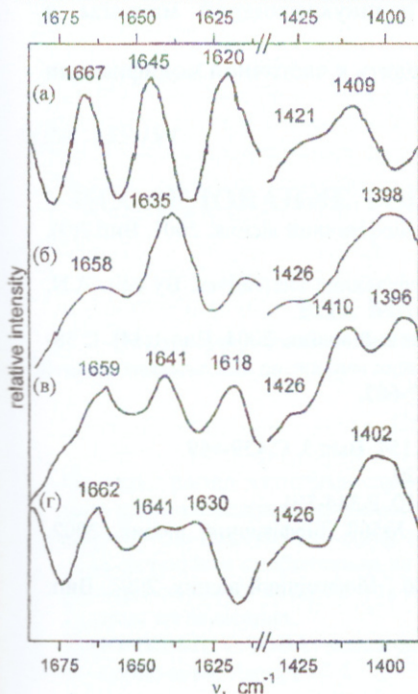


Рис. 7. Раман спектры комплексов ActIII-poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) при pH=4,45 в области колебаний карбонильных и C-NH<sub>2</sub> атомных групп в зависимости от концентрации полинуклеотида: (а)–P/D=0; (б)–P/D=5,7; (в)–P/D=44; (г)–P/D=132; C<sub>D</sub>=6,85×10<sup>-5</sup>

предположения нами были получены Раман спектры комплекса ActIII-poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) в условиях, при которых колебательный спектр лиганда практически не искажает спектр полинуклеотидной матрицы. Было обнаружено, что частота симметричного колебания  $\nu_s$  фосфатной группы полинуклеотида в комплексе претерпевает низкочастотный сдвиг на  $\Delta\nu \approx 5 \text{ см}^{-1}$ . Ранее такой же сдвиг мы наблюдали в инфракрасных спектрах поглощения антисимметричного колебания  $\nu_{as}$  фосфатных групп [1]. Эти факты свидетельствуют о справедливости нашего предположения о формировании в комплексе при мономерном связывании лиганда водородной связи между аминогруппой феноксазонового хромофора и фосфатами полинуклеотидной матрицы. Другой причиной низкочастотного сдвига  $\nu_{as}$  и  $\nu_s$  может быть взаимодействие катионных групп боковых цепей лиганда  $[-N31H(CH_3)_2]^+$  и  $[-N34H(CH_3)_2]^+$  с отрицательно заряженными фосфатными группами двуспирального полинуклеотида. На спектре (см. рис. 7, г) так же видно, что частоты карбонильных колебаний C19=O20 ( $\nu=1641 \text{ см}^{-1}$ ) и C22=O23 ( $\nu=1662 \text{ см}^{-1}$ ) в мономерно связанном состоянии лиганда, по сравнению со свободным ActIII, сместились в низкочастотную область спектра на 4-5  $\text{см}^{-1}$ . такой характер валентных колебаний свидетельствует о том, что эти карбонильные группы лиганда могли образовать водородные связи с аминогруппой цитозина и OH-группой рибозы при прямом контакте или через "мостики" молекул воды. Итак, мономерное связывание при комплексообразовании сопровождается установлением различных водородных связей между донорно-акцепторными группами лиганда и полинуклеотидной матрицы. Это может привести к тому, что в местах локализации лиганда частично модифицируется двуспиральная структура poly(C)·poly(C<sup>+</sup>).

Таким образом, на основе работы [1] и проведенных спектрофотометрических и Раман спектроскопических исследований комплексов лиганда ActIII с двуспиральной poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) в данной работе установлено:

- 1) в отличие от ДНК, феноксазоновый хромофор не интеркалирует в спиральную структуру poly(C)·poly(C<sup>+</sup>), а лиганд ActIII образует с нею комплекс в агрегатном или мономерном состояниях по типу внешнего связывания;
- 2) стабилизация комплексов poly(C)·poly(C<sup>+</sup>)-ActIII достигается путем формирования водородных связей между карбонильными группами и аминогруппой хромофора, фосфатами и аминогруппой цитозина полинуклеотида, взаимодействием катионных групп

межмолекулярной водородной связи этой группой с NH<sub>2</sub>-группой цитозина или с соседними молекулами лигандов.

При дальнейшем росте концентрации полинуклеотида (P/D=44, рис. 7, в) по мере уменьшения концентрации агрегированных лигандов в смесях наблюдается высокочастотный сдвиг на 6  $\text{см}^{-1}$  полосы колебания группы C19=O20. Появляются полосы в области  $\nu=1618 \text{ см}^{-1}$  и  $\nu=1410 \text{ см}^{-1}$ , характерные для неагрегированного лиганда. Однако межмолекулярная водородная связь карбонильной группы C22=O23 с poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) сохраняется. Присутствие полосы при  $\nu=1396 \text{ см}^{-1}$  и равной ей по интенсивности полосы при  $\nu=1410 \text{ см}^{-1}$  в спектрах КР смесей ActIII-poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) при P/D=44 свидетельствует о том, что в этих смесях все ещё достаточно много агрегированного лиганда (~50% агрегированного, ~50% мономерно связанного ActIII, рис.4).

При P/D=132, когда в растворе в основном присутствует мономерно связанный лиганд ActIII (рис. 4, кривая 4), на спектрах КР смесей ActIII-poly(C)·poly(C<sup>+</sup>) (рис. 7, г) полоса колебания хиноидного карбонила C3=O17 претерпевает высокочастотное смещение на  $\Delta\nu=10 \text{ см}^{-1}$ , а полоса колебания группы C2-N18H<sub>2</sub>, наоборот, смещается в низкочастотную область до  $\nu=1402 \text{ см}^{-1}$  (рис.7, а, г). Высокочастотный сдвиг колебания C3=O17 может быть связан с резонансными взаимодействиями карбонильных колебаний цитозина и хиноидного карбонила с сохранением водородной связи C3=O17...H<sub>2</sub>N18-C2 при формировании в этих условиях комплекса мономер ActIII-poly(C)·poly(C<sup>+</sup>). Низкочастотный сдвиг валентного колебания C2-N18H<sub>2</sub>, по-видимому, связан с установлением бифуркационной водородной связи аминогруппы C2-N18H<sub>2</sub> с фосфатной группой PO<sub>4</sub><sup>-</sup> полинуклеотидной цепи. Для доказательства этого

боковых цепей лиганда с сахарофосфатным остовом полинуклеотидной матрицы и возможным образованием водных "мостиков".

- 3) комплексообразование ActIII с poly(C) $\cdot$ poly(C<sup>+</sup>) может приводить к частичной модификации двуспиральной структуры полинуклеотида.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семёнов М.А., Круглова Е.Б., Духопельников Е.В. и др. // Вісн. ХДУ №528. Біофізичний вісник. 2001. Вип.2(9). С.33-39.
2. Anti-Cancer Drug Design: Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxaxone Derivatives. By edit. A.N. Veselkov and D.B. Davies. Sevastopol: Sevantu Press. 2002. 260.
3. Больбух Т.В., Ближнюк Ю.Н, Круглова Е.Б. и др. // Вісн. ХНУ №637. Біофізичний вісник. 2004. Вип.1(14). С.38-42.
4. Глибин Е.Н., Цукерман В.Б., Гинзбург О.Ф. // ЖорХ. 1981. Т.17. Вып.3. С.657-663.
5. Круглова Е.Б. // Биофизика. 1994. Т.39. №2. С.280-288.
6. Набиев И.Р., Ефремов Р.Г., Чуманов Г.Д. // Успехи физических наук. 1988. Т.154. Вып.3. С.459-469.
7. Круглова Е.Б. // Вісн. ХНУ №560. Біофізичний вісник. 2002. Вип.1(10). С.12-20.
8. Smulevich G., Angeloni L., Marzocchi M.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V.610. P.384-391.
9. Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н. // Вісн. ХНУ №560, Біофізичний вісник. 2002. Вип.1(10). С.12-20.
10. Духопельников Е.В., Березняк Е.Г., Иванов А.Ю. и др. // Вісн. ХНУ № 606 , Біофізичний вісник. 2003. Вип. 2(13). С.16-22.