

УДК 57732:5396.199

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ  
АКТИНОЦИНА С ДНК  
6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С  
ПРОИЗВОДНЫМИ АКТИНОЦИНА С РАЗНОЙ ДЛИНОЙ МЕТИЛЕНОВЫХ ЦЕПЕЙ**

Е.Б. Круглова, В.Я. Малеев, Е.Н. Глибнн<sup>1</sup>, А.Н. Весел ков<sup>2</sup>

*Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры . 12. г Харьков . 61085.*

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский государственный технический университет. Россия.*

<sup>2</sup>*Севастопольский государственный технический университет. Севастополь. 335033*

*e-mail: kgi@ioa.rige.kpa.gov.ua*

Поступила в редакцию 11 апреля 2002 г.

Спектрофотометрическим методом в видимой и УФ областях исследовано комплексообразование производных актиноцина с тимусной ДНК в зависимости от количества метиленовых групп (n+2-5) в боковых цепях. Показано, что в системе ДНК-антибиотик образуется два типа комплексов, причем величины мест связывания по первому типу возрастают как с ростом n, так и при увеличении ионной силы растворов. Для всех рассмотренных лигандов в смеси с ДНК построены изотермы связывания в растворах, содержащих  $2 \times 10^{-4}$  М N301 и 0.16 М NaCl. Из анализа изотерм связывания получены величины мест связывания и константы комплексообразования по первому типу. С помощью программы оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей ЭА1.ЯМОО вычислены константы комплексообразования по первому и второму типам связывания и определены величины мест связывания по второму типу, которые составляют для тимусной ДНК и рассмотренных лигандов 5-6 или 7-8 пар оснований для двух приведенных выше ионных сил, соответственно. При анализе изотерм связывания и расчетах параметров комплексообразования учитывали димеризацию рассмотренных лигандов. Показано, что температура плавления (T<sub>m</sub>) ДНК в присутствии производных актиноцина возрастает с уменьшением длины боковых цепей заместителей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДНК, актиноциновые антибиотики, плавление ДНК, константы связывания.

Изучение комплексообразования различных биологически активных лигандов с ДНК, РНК и разными типами поли- и олигонуклеотидов остается до настоящего времени одной из актуальных проблем молекулярной биофизики. В последние годы такие исследования нацелены на изучение специфичности связывания и возможности маркировки поврежденных участков ДНК для направленного синтеза новых эффективных лекарственных средств [1-3]. Широко исследуются новые типы и классы органических соединений и вновь синтезированные аналоги хорошо изученных противоопухолевых и терапевтически активных препаратов [4 - 6]. Проведенные недавно исследования феноксазоновых антибиотиков (аналогов актиномицина й) методами инфракрасной спектроскопии, калориметрии и пьезограмметрии показали различия в индивидуальных характеристиках этих ароматических соединений и их комплексов с ДНК в зависимости от длины боковых цепей, при этом обнаружен существенный вклад молекул воды в процессы связывания антибиотиков со спиральными структурами ДНК [7-10]. Приведенные в настоящей статье результаты спектрофотометрических исследований комплексообразования актиноциновых антибиотиков с ДНК в зависимости от ионной силы растворов позволяют дать дополнительную информацию о специфике взаимодействия этих ароматических молекул с ДНК.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ДНК из тимуса телят фирмы "Berg\`a". Феноксазоновые антибиотики актиноцинового ряда (AcSh - AcTy) с разной длиной метиленовых цепочек (рис.1) были синтезированы Глибинным и др. [11, 12] и использовались без дополнительной очистки. При вычислении концентраций всех исследуемых антибиотиков AcSh - AcTy использовали значение молярного коэффициента экстинкции  $\epsilon_{Sh} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Полученные значения концентраций использовались в дальнейшем для определения молярных коэффициентов экстинкции исследуемых лигандов в УФ-области спектра. Концентрацию ДНК определяли используя значение  $\epsilon_{D} \sim 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [13]. Измерения спектров поглощения проводили н

термостатированных кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1, 2 и 10 мм на спектрофотометре Зресогс! М40 (Германия). Спектрофотометрическое титрование проводили путем добавки в соответствующий раствор антибиотика точных порций раствора ДНК-краситель\*<sup>1</sup> с той же концентрацией лиганда, приготовленного при заведомо больших значениях РЯ) (РЯ) ~ 60-120), где Р - концентрации ДНК, выраженная в молях фосфатов, а О - концентрация антибиотика.

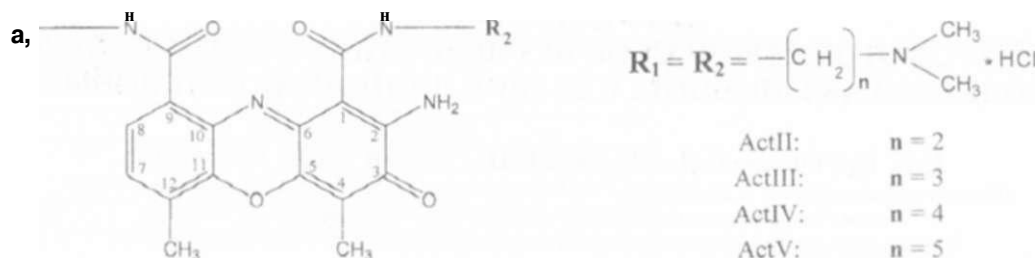


Рис.1. Структурная формула и использованные обозначения для производных актиноина.

\*Рассматриваемые в статье актиноциновые антибиотики, как и целый ряд других биологически активных и лекарственных препаратов, имеют интенсивные полосы поглощения в видимой области спектра, поэтому для их обозначения мы также используем термин "краситель".

Для численного анализа получаемых спектральных зависимостей в широкой области длин волн и концентраций реагирующих компонентов и определения индивидуальных спектров поглощения и констант связывания в простых и более сложных (ДНК-лиганд) системах нами была разработана серия программ оптимизации. Так, расчет равновесного состава смесей, в которых выполняются законы действующих масс (ЗДМ)  $\sum K = \sum X_a(x[C_i])$ , где  $a_i$  - стехиометрические коэффициенты со знаком плюс (+) для реагирующих компонентное и со знаком (-) для продуктов реакции, а  $[C_i]$  - равновесные концентрации компонентов, проводился с использованием оригинального варианта программы оптимизации ПАГ.8, предложенного Хартли и др. [14].

Для вычисления параметров связывания в системах полиэлектролит-лиганд нами были созданы программы на основе ОАБ\$, в которых законы ЗДМ, справедливые для простых химических равновесий, заменялись уравнениями, отражающими связывание лигандов с полимерными матрицами. Так, кооперативное связывание лигандов с полимером описывалось уравнением МакГи и фон Хиппела [15] (программа ОАБ51); связывание двух разных лигандов с одними и теми же местами связывания (в нашем случае одновалентного катиона  $\text{N}^+$  и катиона лиганда с отрицательно заряженными фосфатными группами на полианионах и ДНК) - уравнениями конкурентного связывания [16-18] (программа ОАГ.5N); то же самое, но с учетом двух разных мест связывания лиганда с матрицами двухнитевых полинуклеотидов - уравнениями для двух типов связывания [19] (программа ОА1.52). Во всех программах оптимизации, описанных выше, учитывается мономер-димерное равновесие для свободного лиганда.

В настоящей работе при анализе спектров поглощения смесей ДНК-антибиотик был использован модифицированный вариант программы ОАБ82 фАБ5МСЮ), который позволяет учитывать тот факт, что пары оснований ДНК, участвующие в образовании первого типа комплексов, не учитываются в качестве возможных мест связывания при образовании комплексов второго типа, т.е. существует конкуренция мест связывания.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При смешивании исследуемых антибиотиков с тимусной ДНК,  $\text{AsxP} - \text{AsI}'$  связываются с ДНК с образованием двух типов комплексов, о чем свидетельствуют изменения спектров поглощения смесей как в видимой, так и в УФ областях. В смесях ДНК-лиганд при низких ионных силах  $\text{C}_{\text{маС}} < 3 \times 10^{-3} \text{ M}$  и низких значениях РЯ) наблюдается седиментация образующихся комплексов (рис.2). Это видно по резкому падению поглощения смесей при добавлении минимальных количеств ДНК к раствору антибиотика, по образованию небольшого количества хлопьев осадка в кюветках при перемешивании растворов, а также по отсутствию изобестических точек на спектрах смесей ДНК-краситель в широкой области концентраций ДНК. В связи с этим, для всех исследуемых ароматических молекул анализ их комплексообразования с ДНК проводили при более высоких значениях ионных сил,  $\text{C}_{\text{маС}} > 2 \times 10^{-2} \text{ M}$  (рис.3, а, б).

## Физические механизмы взаимодействия производных актиноцина с ДНК. 6.

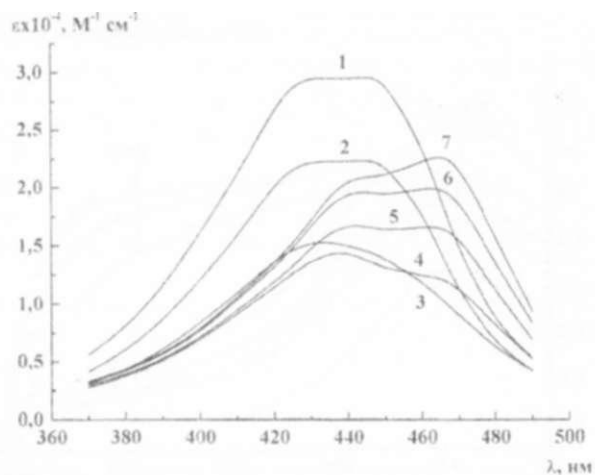


Рис.2. Зависимость спектров поглощения смесей ДНК-АсII в  $3.3 \times 10^{-3}$  M NaCl от концентрации ДНК при постоянной концентрации красителя  $C_{AcII} = 2.91 \times 10^{-5}$  M: 1 – P/D = 0 M; 2 – P/D = 0.8; 3 – P/D = 2.4; 4 – P/D = 4.2; 5 – P/D = 7.4; 6 – P/D = 12.4; 7 – P/D = 36.7.

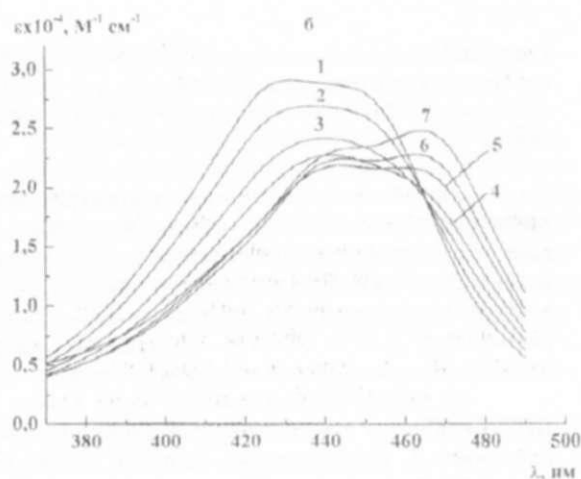
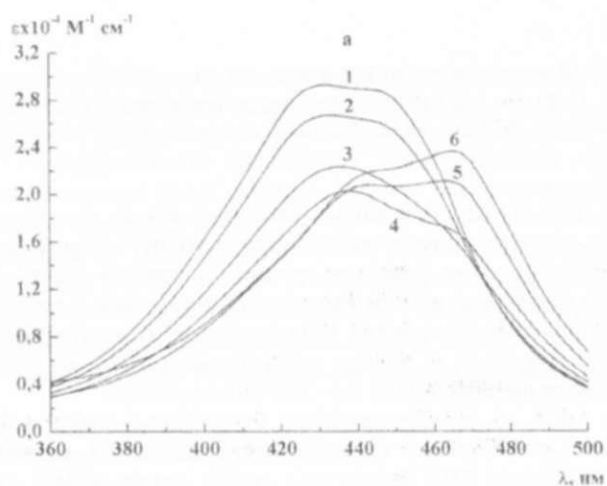


Рис.3. Зависимость спектров поглощения смесей ДНК-АсI от концентрации ДНК в  $2.0 \times 10^{-4}$  M NaCl (а) и в 0.16 M NaCl (б) при постоянной концентрации красителя  $C_{AcI} = 3.16 \times 10^{-5}$  M: 1 - P/O = 0; 2 - P/O = 1.6; 3 - P/O = 2.6; 4 - P/O = 4.2; 5 - P/O = 17.1  $\times 10^{-4}$  M; 6 - P/O = 58.0 (а) и  $C_{AcI} = 2.79 \times 10^{-5}$  M: 1 - P/O = 0; 2 - P/O = 0.6; 3 - P/O = 3.8; 4 - P/O = 5.7; 5 - P/O = 18.9; 6 - P/O = 32.5; 7 - P/O = 71.7 (б)

Из анализа спектров поглощения можно сделать вывод, что при связывании исследуемых антибиотиков с ДНК образуется два типа комплексов, с различными молярными коэффициентами экстинкции (рис.2, рис.3). Образование первого из них в области низких значений P/O приводит к понижению поглощения практически во всей полосе красителя и к смещению максимума полосы в  $\lambda = 440$  nm с соответствующими изобестическими точками в  $\lambda = 475$  nm для  $2.0 \times 10^{-4}$  M NaCl (рис.3, а) и в  $\lambda = 465$  nm для 0.16 M NaCl (рис.3, б). При дальнейшем увеличении концентрации ДНК длинноволновое смещение полосы сопровождается ростом поглощения в максимуме  $\lambda = 465$  nm и образованием второго типа комплексов. Описанные выше эффекты справедливы для всех рассмотренных лигандов АсШ - АсУ. Основные различия для лигандов с разной длиной метиленовых цепочек проявляются в характере изменений концентрационных зависимостей спектров поглощения смесей ДНК-антибиотик, что мы связываем, как будет показано ниже, с разными величинами мест связывания и констант комплексообразования.

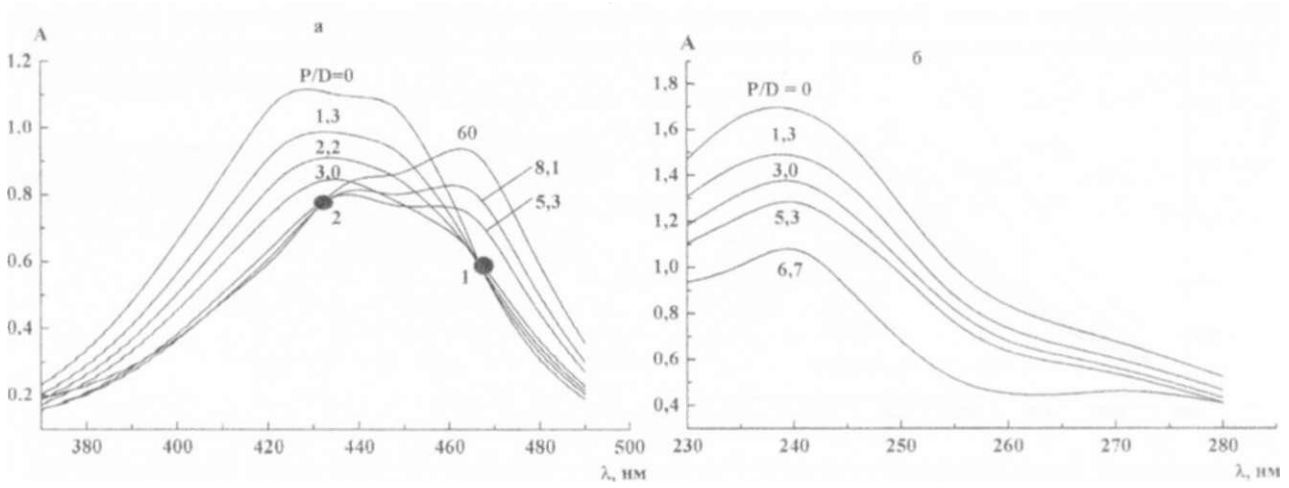


Рис.4. Спектры поглощения смесей ДНК-АсШ] в 2x10<sup>3</sup> М №С1 в зависимости от Р/О в видимой (а) и в УФ (б) областях при постоянной концентрации антибиотика С<sub>Дс,ш</sub> = 4.07x10<sup>-5</sup> М. Цифрами 1 и 2 отмечены изобестические точки. Спектры в УФ области получены путем вычитания из спектра поглощения смеси ДНК-лиганд поглощения соответствующей концентрации ДНК.

Из рис.4, а видно, что на спектрах смесей ДНК-АсШ, полученных при постоянной концентрации красителя, можно выделить две изобестические точки, которые присутствуют на спектрах поглощения смесей всех рассмотренных антибиотиков с ДНК в растворах с разными ионными силами. Используя длины волн, соответствующие этим изобестическим точкам, можно оценить величины некоторых параметров, в частности, величин мест связывания лигандов с ДНК, без каких-либо дополнительных предположений о моделях и типах связывания. В УФ области спектра, как следует из рис.4, б, с ростом концентрации ДНК происходит интенсивное уменьшение поглощения антибиотика во всем интервале (230 нм - 280 нм) длин волн.

В первой изобестической точке (точка 1 на рис.4, а), соответствующей перераспределению в смеси ДНК-антибиотик концентрации свободного и связанного в комплексе 1 лиганда, можно вычислить, количество комплекса 2. Действительно, запишем поглощение в системе ДНК-лиганд при любой длине волны, следуя закону Ламберта-Бера, в виде

$$A = C_{\Gamma} \epsilon_{\Gamma} + C_{\kappa 1} \epsilon_{\kappa 1} + C_{\kappa 2} \epsilon_{\kappa 2} \quad (3),$$

где  $C_{\Gamma}$ ,  $C_{\kappa 1}$  и  $C_{\kappa 2}$  - концентрации, соответственно, свободного и связанного в комплексе 1 и 2 лиганда, а  $\epsilon_{\Gamma}$ ,  $\epsilon_{\kappa 1}$  и  $\epsilon_{\kappa 2}$  - молярные коэффициенты экстинкции каждой из вышеперечисленных форм свободного и связанного красителя. Отметим, что величина  $\epsilon_{\Gamma}$  в каждой из смесей ДНК-лиганд зависит от  $C_{\Gamma}$  в соответствии с мономер-димерным равновесием, как  $\epsilon_{\Gamma} = \frac{[\Gamma] \epsilon_{\Gamma 1} + [D] \epsilon_{\Gamma 2}}{C_{\Gamma}}$

Поскольку в точке 1 (рис.4, а)  $\epsilon_{\Gamma} = \epsilon_{\kappa 1}$  выражение (3) можно переписать следующим образом

$$A = \epsilon_{\Gamma} (C_{\Gamma} + C_{\kappa 1}) + C_{\kappa 2} \epsilon_{\kappa 2} \quad (4),$$

а используя для лиганда закон сохранения масс  $C_0 = C_{\Gamma} + C_{\kappa 1} + C_{\kappa 2}$ , как

$$A = \epsilon_{\Gamma} (C_0 - C_{\kappa 2}) + C_{\kappa 2} \epsilon_{\kappa 2} \quad (5)$$

откуда получим

$$C_{\kappa 2} = \frac{A - \epsilon_{\Gamma} C_0}{\epsilon_{\kappa 2} - \epsilon_{\Gamma}} \quad (6).$$

## Физические механизмы взаимодействия производных актиноцина с ДНК. 6

На рис.5 приведены нормированные к общим концентрациям лигандов концентрации комплекса 2, вычисленные по уравнению (6) для двух красителей рассмотренного ряда АсШ и АсIV при разных ионных силах в зависимости от P/O.

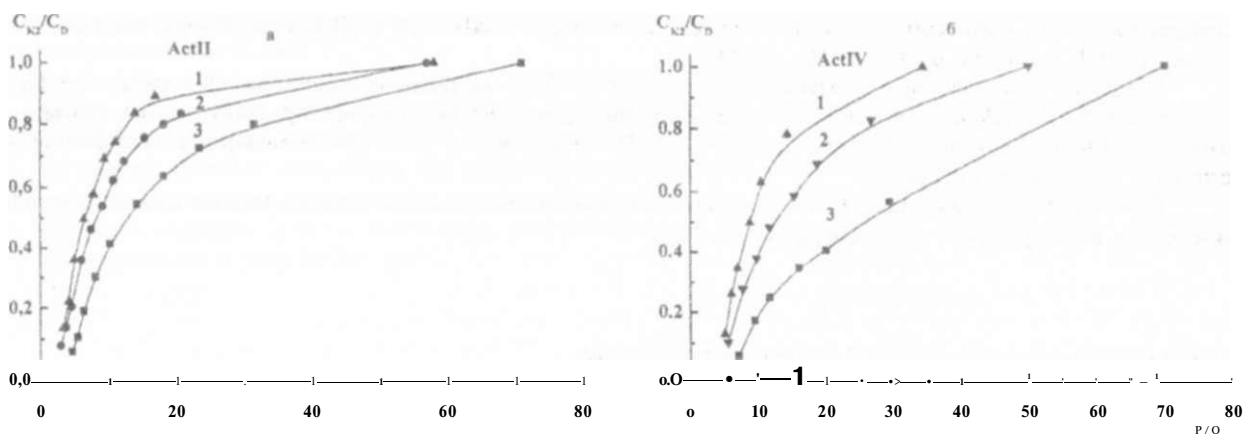


Рис.5. Зависимость относительной концентрации комплекса 2 от P/O для АсШ и АсIV при разных концентрациях соли: 1 -  $2 \times 10^{-2} \text{ M NaCl}$ ; 2 -  $8,5 \times 10^{-2} \text{ M NaCl}$ ; 3 -  $0,16 \text{ M NaCl}$ .

Аналогичные зависимости были получены нами и для антибиотиков АсШ<sup>1</sup> и АсIV. Из данных, приведенных на рис.5, следует, что чем выше ионная сила растворов и больше длина боковых метиленовых цепочек, тем при больших значениях  $P/O$  весь антибиотик переходит в полностью связанное состояние в виде комплекса 2. При этом ошибка при вычислении  $P/O$  и, соответственно,  $C^*$ , возрастает при переходе к красителям АсIV и АсIУ и в растворы с высокими ионными силами. Представляя приведенные выше зависимости в более узком интервале P/O (рис.6, а б), можно определить предельные величины  $P/O_{\text{пр}}$ , равные отрезкам, отсекаемым на оси P/O при  $C_{K2}/C_D \rightarrow 0$ . Ниже этих значений P/O комплекс 2 практически отсутствует в смесях ДНК-Ас\* в спектрофотометрически значимых количествах.

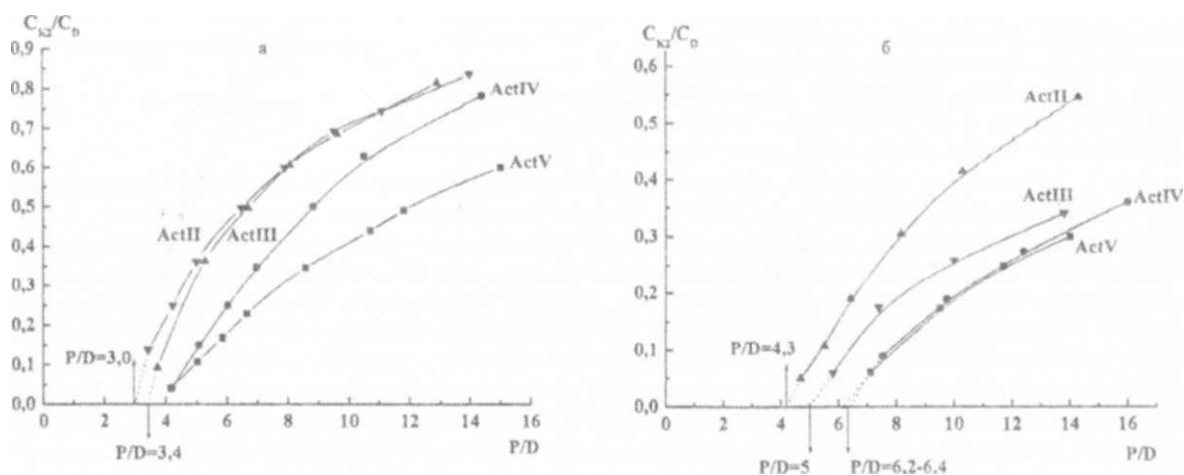


Рис.6. Зависимость относительной концентрации комплекса 2 от P/D для разных лигандов при  $C_{\text{ДНК}} = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$  (а) и  $C_{\text{ДНК}} = 0,16 \text{ M}$  (б).

Сравнивая рис.6, а и б, можно отметить, что величины  $P/O_{гП}$  увеличиваются для одного и того же антибиотика с ростом ионной силы раствора, а при одной и той же ионной силе тем больше, чем больше длина боковых метиленовых цепочек. Можно предположить, что величины  $P/O_{гП}$  непосредственно связаны с очень важными параметрами - величинами мест связывания исследуемых антибиотиков с ДНК по первому типу. Для подтверждения этого предположения сравним найденные граничные значения  $P/O_{гП}$  с величинами  $1/r^0$ , отсекаемыми на оси  $r$  изотерм связывания каждого из лигандов АсШ-Ас1У с ДНК при  $r/C \rightarrow 0$ , где  $r$  степень заполнения ДНК лигандом, равная  $r = (C^0 - CГ)/C^0$ .

Изотермы связывания, т.е. зависимости  $r/C$ , от  $r$ , были вычислены нами для всех рассмотренных антибиотиков АсШ-Ас1У при двух ионных силах растворов. Длина волны, в которой рассчитывались изотермы, соответствовала изобестической точке 2 (рис.4, а). Полагаем, что в этой точке молярные коэффициенты экстинкции комплексов 1 и 2 равны.

В этом случае уравнение (3), описывающее поглощение любой смеси с двумя типами комплексов, при длине волны, в которой  $\epsilon_1 = \epsilon_2$ , преобразуется к виду

$$A = C_{г1} \epsilon_{г1} + (C_{г2} + C_{г3}) \epsilon_{г2} \quad (7)$$

и с учетом закона сохранения общей концентрации получим

$$A - C_{г1} \epsilon_{г1} + (C^0 - C_{г1}) \epsilon_{г2} = C^0 \epsilon_{г2} + C^1 - x (\epsilon_{г1} \epsilon_{г2}) \quad (8)$$

откуда

$$C_{г1} = (A - C_{г1} \epsilon_{г2}) / (\epsilon_{г1} - \epsilon_{г2}) \quad (9)$$

Таким образом, и каждой из смесей ДНК-Ас! по уравнению (9) можно вычислить концентрацию свободного красителя и построить по этим данным суммарные изотермы связывания. Такие изотермы для антибиотиков АсИП и Ас1У приведены ниже на рис.7.

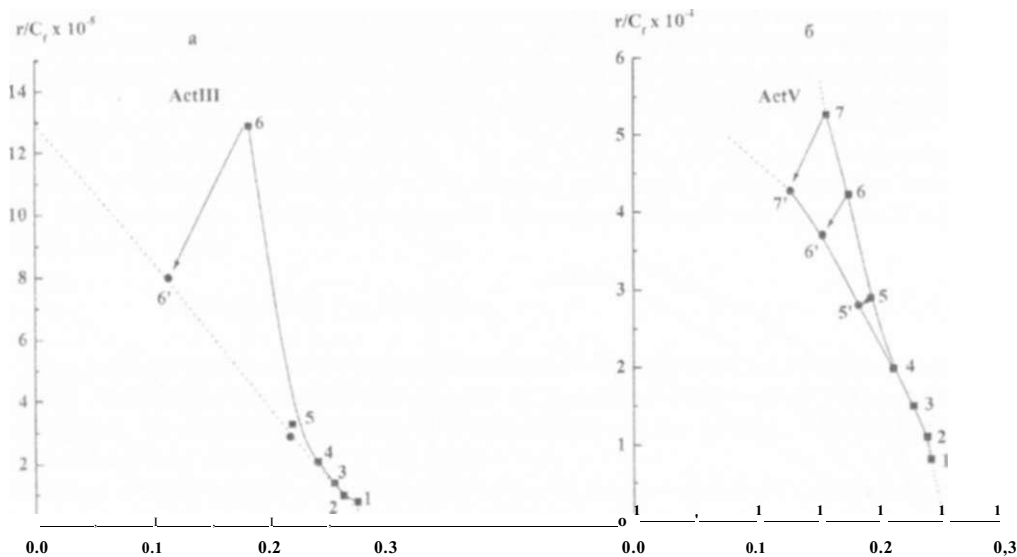


Рис.7. Изотермы связывания, рассчитанные по уравнению (9) в  $\lambda = 433$  нм для смесей ДНК- АсИП (а) и ДНК-Ас1У (б) в  $2 \times 10^{-2}$  М *NaCl*. Точки 1 -  $P/O=0,4$ ; 2 -  $P/O=1,3$ ; 3 -  $P/O=2,2$ ; 4 -  $P/O>3,2$ ; 5 -  $P/O=3,8$ ; 6 -  $P/O>5,3$  (а) и 1 -  $P/O>0,5$ ; 2 -  $P/O>1,5$ ; 3 -  $P/O=2,4$ ; 4 -  $P/O>3,3$ ; 5 -  $P/O=4,2$ ; 6 -  $P/O=5,0$ ; 7 -  $P/O=5,8$  (б) принадлежат суммарной изотерме. Точки 5', 6' и 7' получены путем вычитания из общего количества связанного лиганда соответствующей концентрации комплекса 2.

## Физические механизмы взаимодействия производных актиношша с ДНК. 6. ...

ТОЧКИ 1, 2, и т. д на рис. 7 принадлежат суммарной изотерме связывания. Точки со штрихом - изотерме связывания  $\gamma, C, -$ , получаемой путем вычитания из общего количества связанного лиганда концентрации комплекса 2. определяемого для каждой смеси по уравнению (6). как описано выше. При расчете изотерм связывания необходимо учитывать, что начиная с некоторых значений  $P/O$ . равновесная концентрация свободного лиганда становится слишком малой для ее определения с достаточной степенью точности спектрофотометрическим методом. Поэтому на приведенных выше рисунках изотермы связывания обрываются в тех точках, где  $C, < 10^{-6}$  М.

Сравнивая суммарные изотермы связывания антибиотиков АсШ - АсУ с ДНК в растворах с низкими и высокими ионными силам можно отметить, что в растворах с низкими ионными силами изотерма  $\gamma, C,$  носит слабо выраженный кооперативный характер для лигандов с большей длиной боковых цепей (рис.7, б). Величины констант связывания для комплексов первого типа, равные отрезкам, отсекаемым на оси  $\gamma/C:$  при  $\Gamma \rightarrow 0$ , возрастают по сравнению с константами связывания тех же антибиотиков с ДНК в растворах с высокими ионными силами (рис.8). Величины мест связывания для комплексов первого типа, соответственно, увеличиваются в ряду АсШ - АсУ.

$\gamma, C > 10^{-6}$

6 г

5 г

Рис.8. Изотермы связывания актиноциновых антибиотиков по первому способу связывания в растворах с высокими (0.16 М №С1) ионными силами, полученные путем вычитания из общего количества связанного лиганда концентрации комплекса 2 (точки): 1 - АсТ11; 2 - АсШ!; 3 - АсЙУ; 4 - Ас1 V. Пунктирные кривые - соответствующие линейные аппроксимации кривых  $\Gamma/C$  Величины равные  $1/\Gamma^0$ , где  $\Gamma^0$  - отрезки, отсекаемые на оси  $\gamma$ , при  $\Gamma/C \rightarrow 0$ . соответствуют величинам мест связывания для комплексов первого типа.

$1/\Gamma = 5$   
 $1/\Gamma = 4.4$

п.1 | 0.2      0.3

$1/\Gamma = 5.8$

Приведенные на рис.8 изотермы  $\gamma, C,$  позволяют сравнить параметры связывания всех рассмотренных антибиотиков с тимусной ДНК в растворах с низкими ионными силами. Из рис.8, а видно, что зависимости  $\gamma/C$  от  $\gamma$  для всех лигандов АсШ - Ас1\'' практически линейны, что соответствует некооперативному способу связывания. Сравнивая величины  $P/\Gamma$  (рис.6, а. б) с обратными величинами  $1/\Gamma^0$  (рис.8), можно отметить, что эти значения практически совпадают и равны величинам мест связывания каждого из антибиотиков с ДНК по первому типу. Другими словами, в системах ДНК-антибиотик комплекс 2 в спектрофотометрически значимых количествах не образуется при максимальном заполнении комплексом 1 матрицы ДНК. Этот вывод позволяет сделать выбор в пользу такой модели связывания, в которой места связывания (пары оснований ДНК), занятые лигандом в комплексе 1 не могут быть местами связывания для комплексов второго типа.

С учетом описанных выше экспериментальных данных, мы выбрали соответствующую модель комплексообразования (и программу оптимизации), учитывающую следующие факторы: (1) комплексы первого типа некооперативны (высокие ионные силы) или слабо кооперативны (низкие ионные силы); (2) величины мест связывания по первому типу для каждого лиганда определяются из анализа изотерм связывания или зависимостей  $C^k/C^0$  от  $P/O$ ; (3) молярные коэффициенты экстинкции антибиотиков в связанном состоянии в виде комплекса 2 могут быть найдены из спектров насыщения при больших значениях  $P/O$ , при этом начальные приближения для констант образования комплексов первого типа считаются известными из анализа изотерм связывания. Параметры связывания комплексов второго типа были вычислены нами с использованием программы оптимизации ОАБЗМОЭ с учетом всех выше перечисленных факторов по модели двух способов связывания. Полученные величины констант и величин мест связывания приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения констант связывания лигандов АсШ - АстУ, рассчитанные по программе ПАБМОР в приближении двух способов связывания при разных значениях ионных сил раствора

	$2 \times 10^{-2}$ М NaCl		0,16 М NaCl	
	$K_1, K_2$ (фосфатов)	$p^{(2)}$ (пар оснований)	$K_1$ P (фосфатов)	$p^2$ (пар оснований)
АсШ	$2,0 \times 10^5$ $p = 3, \gamma^4 = 1$	$7,4 \times 10^6$ $p^2 = 5$	$5,6 \times 10^4$ $p = 4$	$1,04 \times 10^6$ $p^2 = 7-8$
АсШ!	$1,3 \times 10^5$ $p = 3, \gamma = 1$ $1,3 \times 10^5$ $p = 3, \gamma = 2$	$2,4 \times 10^6$ $p^2 = 5$ $7,3 \times 10^5$ $p^2 = 5$	$4,6 \times 10^4$ $p = 5$	$2,2 \times 10^5$ $p^2 = 7-8$
АсОУ	$9,9 \times 10^4$ $p = 4$	$1,7 \times 10^6$ $p^2 = 5$	$3,9 \times 10^4$ $p = 6$	$2,0 \times 10^5$ $p^2 = 7$
АстУ	$6,3 \times 10^4$ $p = 4, \gamma = 2$	$3,4 \times 10^5$ $p = 6, \gamma = 2$	$4,0 \times 10^4$ $p = 6$	$1,7 \times 10^5$ $p^2 = 7-8$

$K_1$  и  $K_2$  - обозначения для констант связывания актиноциновых антибиотиков по первому и второму способам связывания, соответственно;

P - величина места связывания антибиотиков по первому способу связывания, выраженная в количестве фосфатов ДНК, приходящихся на одну связанную молекулу антибиотика;

$p^{(2)}$  - величина места связывания антибиотиков по второму способу связывания, выраженная в количестве пар оснований ДНК, приходящихся на одну связанную молекулу антибиотика;

$\gamma^4$  - обозначения для величин факторов кооперативности [15].

Анализ кривых плавления смесей ДНК-антибиотик при разных ионных силах с учетом вычисленных параметров комплексообразования свидетельствует о наличии корреляции между величинами констант связывания и температурами плавления смесей ДНК-лиганд в зависимости от длины метиленовой цепочки. Это проявляется на примере первого типа комплексов в области относительно высоких ионных сил при плавлении смесей ДНК-лиганд при  $P/O = 4$  (микрокалориметрические измерения), когда  $T_{gp}$  увеличивается с уменьшением  $p$  [9]. В условиях низких ионных сил для смесей с большими значениями РЛЭ (рис.10), когда в системе ДНК-лиганд преобладает комплекс 2. температура плавления ДНК в присутствии антибиотиков также тем выше, чем меньше длина метиленовой цепочки и больше соответствующая константа связывания.

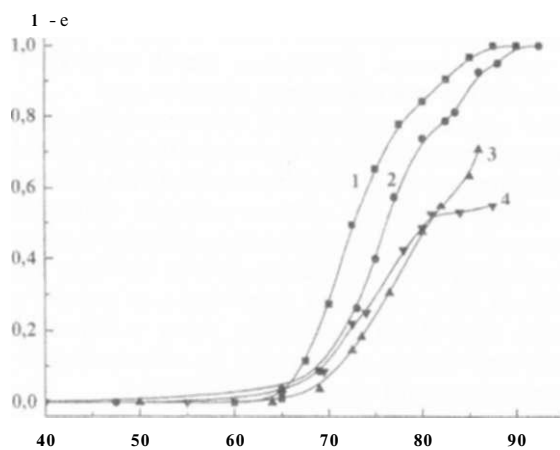


Рис.12. Кривые плавления смесей ДНК-антибиотик при  $P/O = 17-20$  в  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl: для ДНК в отсутствие красителя (1); в присутствии АсЮ (2); в присутствии АсШ! (3); в присутствии АсШ (4),  $C^0 = 1,56 \times 10^{-4}$  М.  $C^0 = (6-7) \times 10^{-6}$  М.

В таких смесях для всех антибиотиков температура начала плавления смеси практически совпадает с такой же для свободной ДНК, из чего можно предположить, что в начале выплавляются не занятые антибиотиком участки ДНК. С ростом температуры на кривых плавления ДНК в присутствии ароматических соединений АсШ-АстУ наблюдается двухступенчатость, что, по-видимому, связано с высокой сайт-специфичностью связывания феноксазоновых антибиотиков с ОС-последовательностями [2,3]. При этом выплавление участков ДНК происходит при больших  $T_g$  по мере уменьшения длины метиленовой цепочки



## Физические механизмы взаимодействия производных актиноцина с ДНК. 6. ...

антибиотика. Для АсШ и АсШ1 наблюдаемые смещения максимальны (рис.10).

### ВЫВОДЫ

Таким образом, спектрофотометрический анализ комплексообразования синтетических актиноциновых антибиотиков с тимусной ДНК показал, что в таких системах образуются два типа комплексов как при низких ( $2 \times 10^{-2}$  М NaCl), так и высоких (0,16 М NaCl) ионных силах растворов. Первый тип комплексов можно интерпретировать как внешнее связывание лиганда (возможно в большой или малой бороздке ДНК), которое характеризуется ростом величин мест связывания от 3 до 4 при  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl и при 0,16 М NaCl от 4,3 до 6 фосфатов на одну связанную молекулу антибиотика АсШ - Ас1У. При этом наблюдается уменьшение констант связывания антибиотиков с ДНК при образовании первого типа комплексов с ростом длины метиленовых цепочек. Для антибиотиков Ас11У и Ас1У взаимодействие с ДНК по первому способу связывания в растворах с низкими ионными силами слабо кооперативно. Анализ спектров поглощения смесей для этих антибиотиков по уравнению МакГи и фон Хиппеля с учетом кооперативного связывания лигандов, дает наилучшее согласие с экспериментальными данными при факторе кооперативности порядка  $\sigma = 2$ . Второй способ связывания можно классифицировать как специфическое связывание. Для этого типа комплексов величины мест связывания практически не зависят от длины боковых метиленовых цепочек актиноциновых антибиотиков и составляют 5-6 или 7-8 пар оснований ДНК при низкой и высокой ионных силах растворов, соответственно. Можно предположить, что столь большие значения величин мест связывания при таком связывании антибиотиков объясняются сиквенс-специфическим встраиванием (интеркаляцией) феноксазонового хромофора между ОС-парами оснований в двойной спирали ДНК. В таком случае для ДНК из тимуса теленка с приблизительно равным АТ:ОС составом, часть оснований, учитываемая при расчете изотерм связывания или в программах оптимизации в виде общей концентрации CP ДНК, реально не участвует в образовании мест связывания для второго типа комплексов и соответствующие величины мест связывания получаются завышенными. Для антибиотика АсШ с двумя метильными группами в боковой цепи хромофора наблюдаются максимальные значения констант комплексообразования по двум способам связывания, что, по-видимому, в значительной степени определяет максимальную антиопухольную активность этого антибиотика в рассматриваемом ряду синтетических производных актиноцина с различным количеством метильных групп в боковых цепях феноксазоновых хромофоров.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке по программе ГМТАС'97, грант 31753.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кш§ Б.Т.К. //Сшт.Орт.51гис1.Вю1. 1994. У.4. Р.351-364.
2. ^'еттег О.Р., Оеп/ап Р.В.//Сигг.Орт.51гис1.Вю1. 1997. У.7. Р.355-361.
3. СМгез ТВ.//Сигг.Орт.51гис1.Вю1. 1998. У.8. Р.314-320.
4. ХУасПап\* К.М., УЫи В., Типе Сп.-5Н.//Вюспегтшгу. 1998.У.37. Р.11915-11923.
5. Кагаи^еи' Ь., СПЫп Е.М., Малеуу У.Уа. Стеууопу О., Оогкеп В., Оауле5 Э.В., Уе5елкоу А.Ш/Апп-Сапсер Э Ш ЕОе518п. 2000. V. 15. Р.331-338.
6. Кривцова М.А., Морошкина Е.Н., Глибин Е.Н., Фрисман Э.В.//Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. Вып.1. С.149-155.
7. Семенов М.А., Гасан А.И., Малеев В.Я. и др.//Вісн.Харк.ун-ту. №488.Бюфїзичний вісник. 2000. Вип..6(1). С. 14-18.
8. Семенов М.А., Сагайдакова Н.Н., Большух Т.В. и др.//Вісн.Харк.ун-ту. №497.Бюфгзичний Вісник. 2000. Вип.2(7). С. 16-23.
9. Семенов М.А., Большух Т.В., Березняк Е.Г. и др.//Вюн.Харк.ун-ту. №528. Бюфїзичний вісник. 2001. Вип.2(9). С.40-44.
10. Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н.//Вісн.Харк.ун-ту.. Бюфїзичний вісник. 2002 (в печати).
11. Глибин Е.Н., Плеханова Н.Г., Овчинников Д.В., Коршунова З.И.//ЖОр.Х. 1996. Т.32. Вып.2. С.406-408.
12. Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г.//ЖОр.Х. 1997. Т.33. Вып.10. С. 1573-1576.
13. МиПег XV., Сго1пег5 О.М./УЕигЛ.ВюсНет. 1975. У.54. Р.267-277.
14. Хартли Ф., Бергес К., Оллок Р.Равновесия в растворах. М.:Мир. 1983. 360 С.
15. МсОее Ш, У О П НІрре1 Р.Н.//1/Мо1.Вю1. 1974. У.86. N.3. Р.469-489.
16. Нечипуренко Ю.Д.//Молекуляр.биология. 1984. Т. 18. №4. С. 1066-1080.
17. Круглова Е.Б. //Молекуляр.биология. 1991. Т.25. С.60-68.
18. Круглова Е.Б.//Молекуляр.биология. 1993. Т.27. С.655-665.
19. Круглова Е.Б. //В'юн.Харк.ун-ту. №525.Бюфгзичний вісник. 2001. Вип.1(8). С.27-33.