

**Список литературы / References:**

1. Privalov P.L., Plotnikov V.V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids. *Therm. Acta.*, 1989, vol. 139, pp. 257-277.
2. Тараховский Ю.С. *Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ*. М.: Издательство ЛКИ, 2011, 280 с. [Tharachovsky Yu.S. *Intellectual lipid's nanoccontainers at address transport of medical substances*. Moscow, LKI, 2011, 280 p. (In Russ.)]
3. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцетина) с мультиламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилхолина. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 1, с. 78-84. [Tharachovsky Y.S., Kuznetsov S.M., Vasilyev N.A., Egorochkin M.A., Kim Yu.A. Taxifolin interaction (dihydroquercetin) with multilamellar liposomes from dimitristoyl phosphatidylcholine. *Biophysicist*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 78-84. (In Russ.)]
4. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. *Липидные мембраны при фазовых превращениях*. М.: Наука, 1992, 125 с. [Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. *Lipid membrane in phase transformations*. M.: Science, 1992, 125 p. (In Russ.)]
5. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. *Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние*. М.: Изд-во Наука, 1986, 280 с. [Feigin L.A., Svergun D.I. *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*. New York: Plenum Press, 1987, 280 p. (In Russ.)]
6. Алексеева О.М., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Рыков В.А., Фаттахов С.Г., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. Исследование взаимодействия мелафена с фосфолипидными мембранами. *ДАН*, 2009, т. 427, № 6, с. 837-839. [(In Russ.)]
7. Кривандин А.В., Фаткуллина Л.Д., Шаталова О.В., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Исследование встраивания антиоксиданта ИХФАН в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Химическая физика*, 2013, т. 32, № 5, с. 91-96. [Krivandin A.V., Fatkullina L.D., Shatalova O.V., Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Small Angle X-ray Scattering Study of the Incorporation of ICHPHAN Antioxidant in Liposomes. *Russian Journal of Physical Chemistry B.*, 2013, vol. 7, no. 3, pp. 338-342. (In Russ.)]
8. Филиппов А.В., Рудакова М.А., Гиматдинов Р.С., Семина И.Г. *Диффузия липидов в биологических мембранах*. Учебное пособие для студентов третьего и четвертого курсов специализации. Медицинская физика физического факультета. Казань, 2006. [Filippov A.V., Rudakova M.A., Gimatdinov P.S., Semina I.G. *Lipids diffusion at biological membranes*. Educational material for students of third and fourth courses specialization. Medical physics of physics department. Kazan, 2006. (In Russ.)]
9. Геннис Р. *Биомембраны – Молекулярная структура и функции*. М., изд-во МИР, 1997г. [Gennis R.B. *Biomembranes. Molecular structure and function*. M.: Mir, 1997. (In Russ.)]
10. Lindblom G., Oradd G., Filipov A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem Phys Lipids*, 2006, vol. 141, pp. 179-184.

**ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ СРЕДЫ И ПРИРОДЫ ПРОТИВОИОНОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  
МОЛЕКУЛЫ ДНК С ПРОИЗВОДНЫМИ АКТИНОЦИНА**

Морошкина Е.Б.

Санкт-Петербургский государственный университет  
Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия  
e-mail: evmorosh@mail.ru

**Аннотация.** Взаимодействие ДНК с различными производными актиноцина, аналогами антибиотика актиномицина D, было исследовано спектральными, гидродинамическими и оптическими методами. Термодинамические параметры взаимодействия и стехиометрия комплексов были определены с помощью спектрофотометрического титрования. Способ связывания и структура комплексов определялись с помощью анализа изменений характеристической вязкости и оптической анизотропии макромолекулы при образовании комплекса. Была исследована зависимость термодинамических параметров и способа связывания с ДНК производных актиноцина от природы его заместителей и ионной силы среды. Показано, что протонированные заместители хромофора увеличивают сродство лиганда к ДНК. Интеркаляция актиноцинового хромофора в двойную спираль ДНК происходит только при оптимальной длине линкера, соединяющего хромофор с протонированной группой заместителя. В случае краунсодержащих производных актиноцина природа противоионов и ионная сила среды оказывает влияние не только на сродство соединения к ДНК, но и на его способ связывания с макромолекулой.

**Ключевые слова.** ДНК, бензокраунсодержащие производные актиноцина, спектрофотометрия, вискозиметрия, оптическая анизотропия, взаимодействие, интеркаляция, ионная сила среды.

THE INFLUENCE OF THE IONIC STRENGTH OF MEDIUM AND THE NATURE OF COUNTERIONS ON THE INTERACTION OF DNA MOLECULE WITH ACTINOCIN DERIVATIVES

Moroshkina E.B.

Saint Petersburg State University

Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 190034 Russia

e-mail: evmorosh@mail.ru

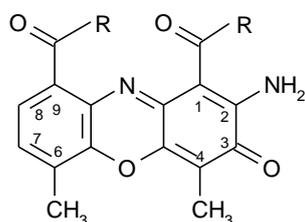
**Abstract.** The interaction of DNA molecule with various actinocine derivatives, which are analogues of the antibiotic actinomycin D, was investigated by spectral, hydrodynamic and optical methods. The thermodynamic parameters of the interaction and the stoichiometry of the complexes were determined by spectrophotometric titration. A mode of binding and the structure of the complexes were determined by analyzing the changes in the intrinsic viscosity and the optical anisotropy of the macromolecule upon complexation. The dependence of thermodynamic parameters and mode of binding with DNA of compounds The dependence of thermodynamic parameters and mode of binding of the actinocine derivatives with DNA on substitutes' nature and ion strength of a medium was studied. It was shown that protonization of substitute of the chromophore gives rise to compaund affinity to DNA. The intercalation of the actinocin chromophore in the DNA double helix occurs only under optimal linker's length which binding the chromophore with protonized group of the substitute. In the case of crown-containing derivatives of actinocine, the nature of the counterions and the ionic strength of a medium affect not only on the affinity of compounds to DNA, but on its mode of binding with the macromolecule.

**Key words:** DNA, benzocrown-containing derivatives of actinocine, spectrophotometry, viscometry, optical anisotropy, interaction, intercalation, ionic strength.

Механизм биологической активности многих низкомолекулярных соединений связан с их способностью взаимодействовать с молекулой ДНК. Это обуславливает интерес к исследованию подобных взаимодействий при создании новых биологически активных соединений. Поскольку молекула ДНК является полианионом, естественно ожидать, что электростатические взаимодействия будут играть большую роль при образовании комплекса макромолекулы с различными низкомолекулярными соединениями, обладающими дипольным моментом и/или катионоидными группами. Выявление роли электростатических взаимодействий обычно проводится при исследовании процессов комплексообразования в условиях разной ионной силы среды.

В настоящей работе взаимодействие молекулы ДНК с рядом производных актиноцина, являющихся аналогами противоопухолевого антибиотика актиномицина D, изучалось методами спектрофотометрии, спектрополяриметрии, вискозиметрии и динамического двойного лучепреломления в условиях разной ионной силы среды. В качестве растворителя использовались водно-солевые растворы NaCl и KCl с ионной силой,  $\mu$ , равной 0.1, 0.01 и 0.001. При  $\mu = 0.1$  электростатические взаимодействия ДНК – лиганд минимальны, поскольку фосфатные группы ДНК практически полностью экранированы противоионами раствора:  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ . При  $\mu = 0.01$  имеет место изотропное набухание макромолекулярного клубка в результате возникающего электростатического расталкивания между статистическими сегментами макромолекулы. При  $\mu = 0.001$  – внутримолекулярное электростатическое расталкивание фосфатных групп приводит к увеличению длины статистического сегмента макромолекулы, т.е. к увеличению ее термодинамической жесткости.

Производные актиномицина D, синтезированные в Санкт-Петербургском Технологическом институте [1], можно разбить на две группы. Соединения первой группы (см. рис. 1) в положениях 1 и 9 актиноцинового хромофора содержат диаминоалкиламино-группировки, протонированные в условиях нейтральных pH.



R = -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> I – n = 2 II – n = 3 III – n = 4 IV – n = 5

R = -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> V – n = 2 VI – n = 3 VII – n = 4

R = -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> VIII – n = 2 IX – n = 3

Рисунок 1 – Структура диаминоалкиламино производных актиноцина (соединения 1-ой группы)

Соединения второй группы (см. рис. 2) в этих же положениях имеют бензокраун группировки, способные ассоциировать ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

Стехиометрию комплексов и термодинамические параметры связывания определяли с помощью спектрофотометрического титрования (СФТ). Способ связывания производных актиноцина с ДНК определяли на основании анализа изменений характеристической вязкости ( $[\eta]$ ) и оптической анизотропии ( $\alpha_1 - \alpha_2$ ) макромолекулы при комплексообразовании по методу, описанному ранее [2, 3]. Данная методика позволяет рассчитать изменения термодинамической жесткости (A) и контурной длины (L) макромолекулы при образовании комплекса и на основании полученных результатов установить интеркаляционное или внешнее (бороздочное) присоединение молекулы лиганда к двойной спирали ДНК.

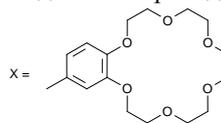
При достаточно сильной экранировке фосфатных групп ДНК противоионами растворителя (0.1M NaCl) протонированные соединения первой группы активно связываются с ДНК одним способом. Термодинамические

параметры этого способа связывания, константы связывания ( $K_{св}$ ), количество мест связывания, приходящееся на пару нуклеотидов, ( $n$ ) и размер места связывания в парах нуклеотидов ( $l$ ), рассчитанные согласно модели с исключенными местами связывания [4], а также способ связывания соединения приведены в таблице 1.

I – R = NHX

II, III, IV - R = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHX

n = 1, 2, 5



V – R = NHY

VI, VII, VIII - R = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHY

n = 1, 2, 5

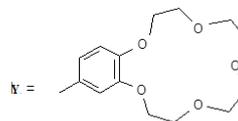


Рисунок 2 – Структура краун-содержащих производных актиноцина (соединения 2-ой группы)

Таблица 1 – Термодинамические параметры и способ связывания производных актиноцина I группы при  $\mu = 0.1$

соединение	Ki*10 <sup>-5</sup> , M <sup>-1</sup>	n	l	Тип связывания
I	8.0	0.60	1.6	бороздочное
II	5.0	0.40	2.5	интеркаляция
III	5.0	0.45	2.4	интеркаляция
IV	3.2	0.65	1.5	димерное
V	6.0	0.40	2.5	интеркаляция
VI	6.5	0.40	2.5	интеркаляция
VII	5.0	0.45	2.4	интеркаляция
VIII	5.5	0.35	2.8	интеркаляция
IX	5.0	0.30	3.3	интеркаляция

Оказалось, что способ связывания актиноцинового хромофора с двойной спиралью ДНК зависит от длины алкильной цепочки заместителей в положениях 2 и 9, а также от состояния аминогруппы в этих заместителях. Соединения с самой короткой (2 CH<sub>2</sub> группы) и самой длинной (5 CH<sub>2</sub> группы) алкильной цепочкой и незамещенной аминогруппой (соединения I и IV (см. рис. 1) связываются с ДНК неинтеркаляционным способом: соединение I располагается в одной из бороздок двойной спирали ДНК, а соединение IV в виде димера связывается с фосфатными группами ДНК.

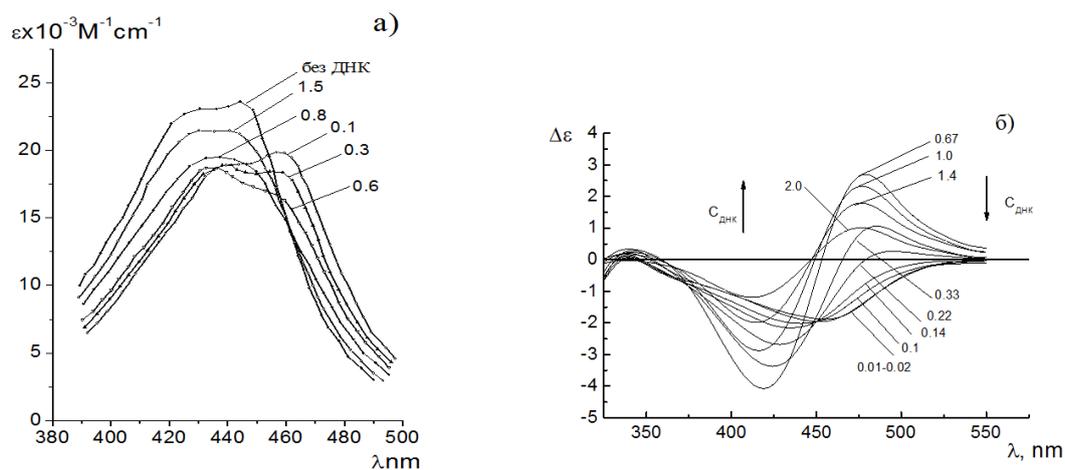


Рисунок 3 – Кривые спектрофотометрического (а) и спектрополяриметрического (б) титрования соединения VI 1-ой группы производных актиноцина,  $\mu=0.001$ , цифры у кривых – соотношение концентраций лиганд/ДНК

При понижении ионной силы сродство протонированных соединений к ДНК значительно повышается. Однако у всех интеркалирующих соединений этой группы при ионной силе, равной 0.001, появляется второй способ связывания. Это проявляется на кривых спектрофотометрического и спектрополяриметрического титрования (см. рис. 2).

Первичный способ связывания в этих условиях является интеркаляцией. При интерпретации кривых титрования было предположено, что местом вторичного связывания лиганда с ДНК является интеркалированная молекула лиганда. При этом образуется «интеркалированный димер».

В этих условиях сродство интеркалирующего лиганда повышается настолько, что спектральные методы не позволяют определить величину константы связывания, т.е.  $K_{св} > 10^7 M^{-1}$ . Определение стехиометрии комплексов показывает, что при появлении вторичного связывания прекращается интеркаляция хромофора лиганда в двойную спираль ДНК. Причем этот процесс начинается тем раньше, чем длиннее алкильная цепочка заместителей. Таким образом оказывается, что наибольшая эффективность интеркаляционного связывания в этом ряду производных актиноцина достигается при длине алкильной цепочки в три  $CH_2$  группы.

Ранее было установлено, что пентапептидные кольца актиномина D ассоциируют, подобно краун-группировкам, ионы Na [5]. С целью моделирования этой способности молекулы антибиотика были синтезированы производные актиноцина, содержащие в амидных группах различные краун-группировки. Введение гидрофильных азакраун-группировок приводило к полному отсутствию взаимодействия хромофора с молекулой ДНК. Взаимодействие с ДНК производных актиноцина, содержащих более гидрофобные бензокраун-группировки (см. рис. 2), зависело, как от химической структуры заместителя, так и от ионного состава растворителя (см. табл. 2 и 3).

Производное, содержащее непосредственно в амидных группах громоздкий радикал –бензо(18-краун-6) (соединение I, рис. 2), связывалось с ДНК неинтеркаляционным способом. Удлинение линкерной цепочки за счет введения второй амидной группы (соединение II, рис. 2) изменяло характер взаимодействия с ДНК актиноцинового хромофора. И по способу связывания, и по сродству к ДНК оно становилось подобным взаимодействию с ДНК наиболее эффективных производных с диалкиламиноалкильным заместителем (соединения V и VI, рис. 1). Однако введение в линкерную цепочку дополнительных  $CH_2$  групп (соединения III и IV, рис. 2) приводило к резкому падению сродства соединения к ДНК и отсутствию интеркаляции хромофора в двойную спираль ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2 – Термодинамические параметры и способ связывания производных актиноцина II группы

соединение	$\mu$	$K_{св} \times 10^{-5}, M^{-1}$	n	Тип связывания
I	0.1	0.6	0.2	димер
	0.001	8.2	0.4	бороздочное
II	0.1	8.0	0.3	интеркаляция
	0.001	28	>0.3	интеркалированный димер
III	0.1	-	-	не связывается
	0.001	0.4	0.4	бороздочное
IV	0.1	-	-	не связывается
	0.001	-	-	не связывается

Еще более сложным оказалось поведение производных актиноцина, содержащих в амидных группах радикал –бензо(15-краун-5). На характер их взаимодействия с ДНК оказывала влияние не только длина линкерной цепочки, соединяющей краун-группировку с хромофором, и ионная сила среды, но и природа противоионов:  $Na^+$  и  $K^+$  (см. табл. 3 и 4).

Таблица 3 – Термодинамические параметры и способ связывания производных актиноцина II группы в присутствии катионов Na в растворе

Соединение	NaCl					
	$\mu=0.1$			$\mu=0.001$		
	$K_{св} \times 10^{-5}, M^{-1}$	n	тип связывания	$K_{св} \times 10^{-5}, M^{-1}$	n	тип связывания
V	1.5	0.5	агрегация	4	0.14	агрегация
VI	4	0.2	интеркаляция	5.5	0.1	бороздочное
VII	-	-	не связывается	0.2	0.04	-
VIII	-	-	не связывается	-	-	не связывается

Таблица 4 – Термодинамические параметры и способ связывания производных актиноцина II группы в присутствии катионов К в растворе

Соединение	КСI					
	$\mu=0.1$			$\mu=0.001$		
	$K_{св} \times 10^{-5}, M^{-1}$	n	тип связывания	$K_{св} \times 10^{-5}, M^{-1}$	n	тип связывания
V	-	-	димер	>10	0.4	интеркаляция
VI	4	0.3	бороздочное	13	0.3	интеркаляция
VII	-	-	не связывается	12	0.2	интеркаляция
VIII	-	-	не связывается	-	-	не связывается

Как и в случае производных, содержащих радикал –бензо(18-краун-6), значительное удлинение линкерной цепочки (соединение VIII, рис. 2) приводило к отсутствию связывания лиганда с ДНК. Однако в присутствии ионов Na интеркаляция хромофра наблюдалась только у соединения VI (рис. 2) при большой ионной силе среды. В присутствии ионов К сродство лигандов к ДНК заметно больше, чем в присутствии ионов Na. Но главное –меняется способ связывания с ДНК: в присутствии ионов К актиноциновый хромофор соединений, содержащих радикал –бензо(15-краун-5), интеркалирует в двойную спираль ДНК. Мы предполагаем, что такое влияние размера противоиона на способ связывания лигандов с ДНК связан с изменением конформации молекулы лиганда. Известно, например, что молекулы бензо(15-краун-5) при ассоциации ионов К могут образовывать структуры, типа сэндвич, в которых соотношение краун/К равно двум. Такая ассоциация ионов К может привести к образованию как внутримолекулярных, так и межмолекулярных взаимодействий краунгруппировок в составе производных актиноцина.

Таким образом, были обнаружены некоторые закономерности зависимости способа связывания актиноцинового хромофора от химической структуры его заместителей:

1. Для интеркаляционного связывания актиноцинового хромофора с ДНК необходимо введение гидрофобных заместителей в 1 и 9 положения хромофора.
2. Близко расположенные к хромофору дополнительные центры связывания создают стерические препятствия для его интеркаляции. Оптимальной длиной линкерной цепочки между хромофором и катионоидной группой заместителя в 1 и 9 положениях хромофора является 2-3  $CH_2$ -группы.
3. Достаточно далеко расположенные центры связывания приводят к отсутствию взаимодействия хромофора с ДНК.
4. Введение краунгруппировок позволяет управлять способом связывания лиганда с ДНК путем изменения ионного окружения макромолекулы.

Все эти наблюдения могут быть использованы в процессе создания новых биологически активных соединений.

#### Список литературы / References:

1. Glibin E.N. Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazone Derivatives. *Anti-Cancer Drug Design*: Eds. A.N. Veselkov, D.B. Davies, Sevastopol: Sevntu Press, 2002, pp. 23-31.
2. Moroshkina E.B., Shishov A.K., Krivtsova M.A., Zhadin N.N., Frisman E.V. Investigation of Influence of Acridine-dyes on Molecular Structure of DNA. *Molecular Biology*, 1975, vol. 9, pp. 668-674.
3. Веселков А.Н., Морошкина Е.Б., Соболева О.И., Фрисман Э.В. Сравнительное исследование взаимодействия с ДНК дауномицина и профлафина в растворе. *Молекулярная биология*, 1984, vol. 18, pp. 481-487. [Veselkov A.N., Moroshkina E.B., Soboleva O.I., Frisman E.V. Comparative Investigation of the Interaction of DNA with Daunomycin and Proflavin in Solution. *Молекулярная Биология*, 1984, vol. 18, pp. 481-487. (In Russ.)]
4. Mc Ghee J.D., von Hippel P.N. Theoretical Aspects of DNA-protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.*, 1974, vol. 86, pp. 469-489.
5. Horti A., Glibin E., Nesterov V. Retention Behaviour of Crown Ethers and Actinomycin D in Reversed-Phase HPLC. *Chromatographia*, 1992, vol. 34, pp. 155-158.