

of Archaeal ribosomal protein L1 interaction with specific RNA fragments. *Topical issues of biological physics and chemistry*, 2016, vol. 1, iss. 1, pp. 239-243 (In Russ.)]

8. Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun.*, 2010, vol. 1, p. 100.

9. Михайлина А.О., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. Идентификация участков на мРНК *Thermus thermophilus* и *Thermatoga maritima*, с которыми взаимодействует рибосомный белок L1. *Молекулярная биология*, 2018, т. 52, с. 1. [Mikhaylina A.O., Kostareva O.S., Nikonova E.Y., Garber M.B., Tishchenko S.V. Identification of the sites on mRNA of *Thermus thermophilus* and *Thermatoga maritima*, which bind ribosomal protein L1. *Molecular Biology*, 2018, vol. 52, p. 1. (In Russ.)]

10. Nevskaya N., Tishchenko S., Gabdoulkhakov A., Nikonova E., Nikonov O., Nikulin A., Platonova O., Garber M., Nikonov S. and Piendl W. Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA. *Nucleic Acid Res.* 2005, vol. 33, iss. 2, pp. 478-85.

11. Tishchenko S., Kljashorny V., Kostareva O., Nevskaya N., Nikulin A., Gulak P., Piendl W., Garber M., Nikonov S. Domain II of *Thermus thermophilus* ribosomal protein L1 hinders recognition of its mRNA. *J Mol Biol.* 2008, vol. 383, pp. 301-305.

12. Nevskaya N., Tishchenko S., Volchkov S., Kljashorny V., Nikonova E., Nikonov O., Nikulin A., Kohrer C., Piendl W., Zimmermann R., Stockley P., Garber M. and Nikonov S. New insights into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 355, iss. 4, pp. 747-759.

ФОРМИРОВАНИЕ АГРЕГАТОВ КРАУНСДЕРЖАЩЕГО ПРОИЗВОДНОГО ФЕНОКСАЗОНА И ИХ КОМПЛЕКСОВ С МОЛЕКУЛОЙ ДНК

Морошкина Е.Б.¹, Седова О.Б.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7/9, г. С-Петербург, 199034, РФ
e-mail: evmorosh@mail.ru

²Костромской государственный университет им. Н.А. Некрасова
ул. 1 Мая, 14, г. Кострома, 156961, РФ

Аннотация. Кинетика образования в водно-солевых растворах упорядоченных агрегационных структур краунсодержащим производным феноксазона (КФ), обладающим противоопухолевой активностью, и его взаимодействие с молекулой ДНК исследованы методами спектрофотометрии и спектрополяриметрии. Показано, что в зависимости от природы противоиона и ионной силы среды КФ образует агрегационные структуры H- и J-типа в результате межмолекулярного взаимодействия радикалов -бензо-(15-краун-5), ассоциирующих катионы K⁺ или Na⁺. Высокое сродство КФ к ДНК в присутствии ионов K⁺ препятствует образованию агрегатов. В присутствии ионов Na⁺ процессы образования агрегатов КФ и его комплексов с ДНК идут параллельно. Наличие краунгруппировок в структуре КФ влияет на его способ связывания с ДНК в зависимости от природы противоиона в растворе.

Ключевые слова. ДНК, краунсодержащие производные феноксазона, спектрофотометрия, круговой дихроизм, взаимодействие, ионная сила среды.

FORMATION OF AGGREGATES OF CROWN-CONTAINING DERIVATIVE PHENOXASONE AND THEIR COMPLEXES WITH DNA MOLECULE

Moroshkina E.B.¹, Sedova O.B.²

¹Saint Petersburg State University
Universitetskaya emb., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia
e-mail: evmorosh@mail.ru

²N.A. Nekrasov Kostroma State University
1May str., 14, Kostroma, 156961, Russia

Annotation. Kinetics of the formation of ordered aggregation structures in aqueous-salt solutions of the crown-containing phenoxazone derivative (CPh), which has antitumor activity, and the interaction of the latter with the DNA molecule were studied by spectrophotometry and spectropolarimetry. It is shown that, depending on the nature of the counterion and the ionic strength of the medium, CPh forms H- and J-type aggregation structures as a result of the intermolecular interaction of -benzo-(15-crown-5) radicals associating K⁺ or Na⁺ cations. The high affinity of CPh to DNA in the presence of K⁺ ions prevents the formation of aggregates. In the presence of Na⁺ ions, the formation of complexes with DNA and CPh aggregates proceeds in parallel. The presence of crown-radicals in the CPh structure affects the way of its binding with DNA depending on the nature of the counterion in the solution.

Key words: DNA, crown-containing derivatives of phenoxasone, spectrophotometry, spectropolarimetry, interaction, ionic strength of the medium.

Исследуемое соединение (см. рис. 1а) было синтезировано в Санкт-Петербургском Технологическом институте наряду с другими краун-содержащими производными феноксазона в качестве аналога противоопухолевого антибиотика актиномицина D (см. рис. 1б) [1]. Краун-группировки этих соединений моделируют способность

пептидолактонных групп актиномина D ассоциировать ионы Na^+ [2]. Исследуемое краунсодержащее производное феноксазона (КФ), содержащее в амидных группах радикалы -бензо-(15-краун-5), проявило наибольшую противоопухолевую активность в этом ряду аналогов [3].

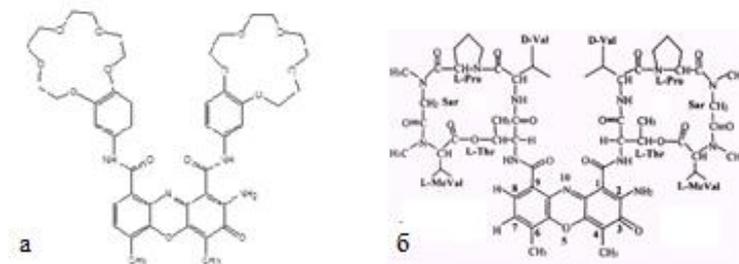


Рисунок 1 – Структура бензокраун-содержащего производного феноксазона (КФ) (а) и актиномина D (б)

Это соединение проявляет спектральные свойства, свидетельствующие об образовании упорядоченных агрегационных структур в водных растворах, содержащих ионы K^+ и Na^+ . В работе [4] было показано, что процесс агрегации в присутствии ионов K^+ сопровождается смещением длинноволновой полосы спектра поглощения в коротковолновую (агрегаты Н-типа) или в длинноволновую (агрегаты J-типа) области в зависимости от концентрации ионов K^+ в растворе (см. рис. 2). В последнем случае появляется круговой дихроизм, сопряженный с длинноволновой полосой поглощения. В присутствии ионов Na^+ независимо от их концентрации в растворе формируются агрегаты J-типа.

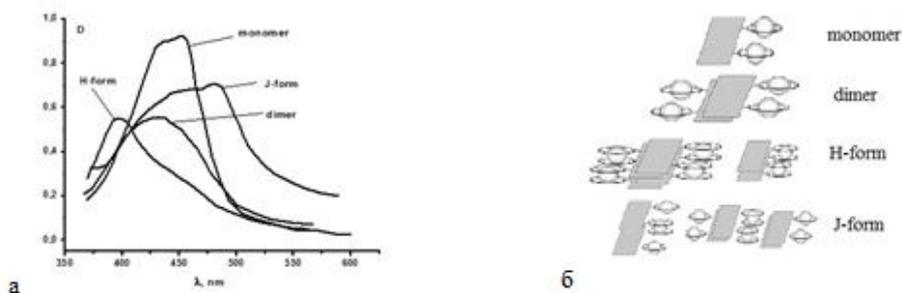


Рисунок 2 – Спектры поглощения (а) и возможные структуры различных форм (б) бензокраун-содержащего производного феноксазона (КФ) в присутствии ионов K^+

В настоящей работе методами спектрофотометрии и спектрополяриметрии исследована кинетика образования и взаимопревращения различных спектральных форм данного соединения в водносолевых растворах, а также влияние ДНК на эти процессы.

Материалы и методы. Исследуемое краунсодержащее производное феноксазона (КФ) растворяли в этиловом спирте, насыщенном KCl или NaCl . Его длинноволновая полоса поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) имеет форму и положение (см. рис. 2а), аналогичные другим производным феноксазона [5,6], и свидетельствует о мономерной форме лиганда в этих условиях. Коэффициент экстинкции $k_{450} = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Для наблюдения за кинетикой образования агрегатов концентрированный спиртовой раствор КФ ($C_{\text{КФ}} \approx 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) разбавляли водно-солевым раствором, содержащим ионы K^+ или Na^+ различной концентрации. Для определения влияния ДНК на процесс образования агрегатов концентрированный спиртовой раствор КФ добавляли в растворы разной ионной силы (μ), содержащие ДНК разной концентрации ($C_{\text{ДНК}}$). Содержание спирта в конечных растворах не превышало 2%.

Процесс образования агрегатов КФ и его взаимодействие с ДНК контролировались измерениями спектров поглощения и кругового дихроизма (КД) растворов. В работе использовали ДНК из тимуса телят фирмы «Sigma» молекулярной массы 10^7 Da . Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре «Speacord UV-Vis», спектры КД – на дихрографе «Jobin Ivon Mark5».

Результаты и обсуждение. *Кинетика образования агрегатов.* При переходе к водно-солевому раствору KCl при $\mu > 0.1$ наблюдается спектр поглощения, соответствующий спектру поглощения димерной формы актиноцинового хромофора, $\lambda_{\text{max}} = 435 \text{ nm}$, [5,6]. Изменений спектров во времени при этом не происходит. При уменьшении ионной силы раствора спектр поглощения меняется во времени. Наблюдается гипсохромный сдвиг его максимума до $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ (см. рис.2). В работе [4] было предположено, что такое изменение спектра поглощения хромофора связано с образованием агрегатов Н-типа. Время перехода из димерной формы КФ в Н-форму зависит от ионной силы раствора в узком диапазоне ее значений $0.01 < \mu < 0.04$. На рисунке 3а показано изменение коэффициента экстинкции КФ при $\lambda_{\text{max}} = 435 \text{ nm}$, соответствующей максимуму спектра КФ в димерной форме.

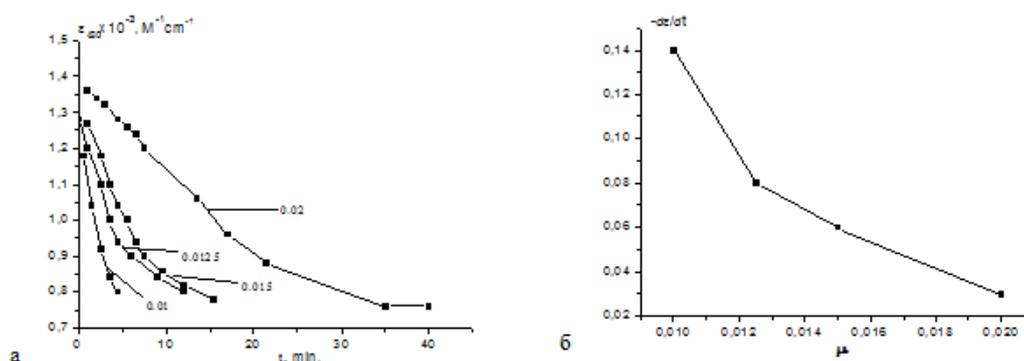


Рисунок 3 – Изменение коэффициента экстинкции лиганда при $\lambda = 435$ нм во времени (а) и зависимость максимальной скорости изменения от ионной силы среды (б) в присутствии ионов K^+ при переходе от димерной формы в Н-форму, $C_{\text{КФ}} = 10^{-5}$ М. цифры у кривых - ионная сила раствора

При дальнейшем уменьшении μ раствора димерная форма КФ либо не образуется, либо ее переход в Н-форму происходит настолько быстро, что она практически не фиксируется данным методом. При $\mu < 0.015$ спектр поглощения Н-формы также начинает меняться со временем, формируя сложный спектр, имеющий длинноволновую составляющую при $\lambda_{\text{max}} = 480$ нм (см. рис. 2). Параллельно с изменениями в спектрах поглощения наблюдается появление и увеличение интенсивности КД, сопряженного с длинноволновой полосой поглощения. В работе [4] эти спектральные изменения были связаны с формированием агрегатов лиганда J-формы. Следует отметить, что этот процесс по нашим наблюдениям индуцируется возбуждением светом при $\lambda \approx 400$ нм. Время перехода из Н- в J-форму практически не зависит от $C_{\text{КФ}}$, но зависит от μ , однако, в отличие от перехода димерной формы в Н-форму, это время связано не столько с изменениями максимальной скорости перехода, сколько со временем индукции этого перехода (см. рис. 4).

В присутствии ионов Na^+ также наблюдаются Н- и J-формы спектров поглощения КФ, однако спектральное поведение КФ в этом случае имеет ряд отличий. Независимо от ионной силы среды образуется Н-форма, которая переходит в J-форму (см. рис. 4). Время этого процесса не зависит от μ , но зависит от $C_{\text{КФ}}$. Интенсивность спектров КД J-формы в присутствии ионов Na^+ почти на порядок ниже, чем в случае K^+ .

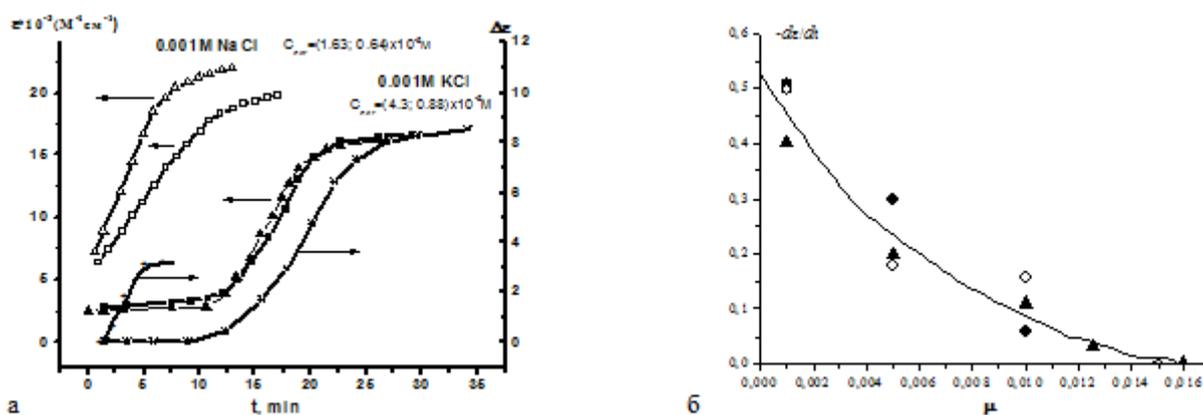


Рисунок 4 - Изменение во времени коэффициента экстинкции лиганда и интенсивности КД при $\lambda = 475$ нм в присутствии ионов K^+ и Na^+ (а) и зависимость максимальной скорости изменения коэффициента экстинкции от ионной силы среды в присутствии ионов K^+ при различных концентрациях КФ (б).

Агрегаты в J-форме, образованной в присутствии ионов K^+ и Na^+ были исследованы с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ). Растворы с одинаковыми $C_{\text{КФ}}$ и μ наносились на подложку из слюды и высушивались. Полученные изображения приведены на рисунке 5.

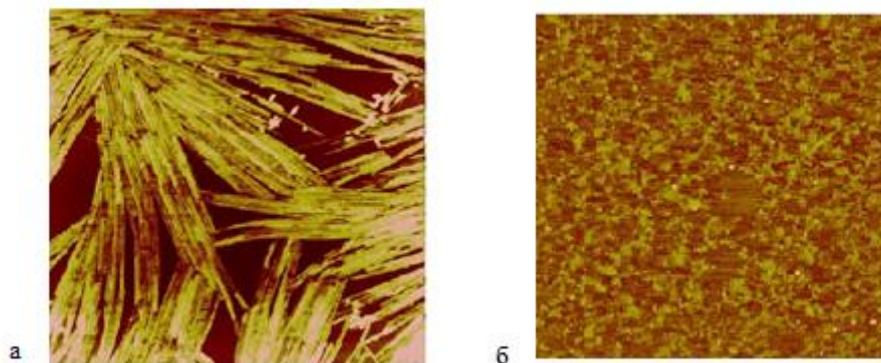


Рисунок 5 – АСМ изображения J-формы КФ, полученной в присутствии ионов K^+ (а) и Na^+ (б) при $\mu=0.001$
Размер изображений $3 \cdot 3$ нм

Образование агрегатов Н- и J-типа в присутствии K^+ , как было предположено в работе [4], происходит в результате межмолекулярного взаимодействия краунгруппировок с образованием комплексов с катионом 2:1 (см. рис. 2б). Меньшие размеры и отсутствие зависимости образования этих агрегатов от концентрации ионов Na^+ предполагает другой механизм их образования. Согласно [7] ионы Na^+ глубже, чем K^+ , погружены в полость краунгруппировки бензо-(15-краун-5), и межмолекулярное взаимодействие между краунгруппировками в этом случае осуществляется с участием молекулы воды. Косвенным указанием на подобный механизм образования агрегатов служит тот факт, что в отличие от J-агрегатов с ионами K^+ J-агрегаты с ионами Na^+ не выпадают в осадок в течение длительного времени.

Влияние ДНК на формирование агрегационных структур лиганда. При добавлении концентрированных спиртовых растворов КФ в ДНК-содержащие растворы КСl при $\mu = 0.1$; 0.01 или 0.001 не наблюдается образование Н- и J-агрегационных форм КФ во всём исследованном диапазоне соотношения молярных концентраций лиганда и ДНК ($C_{КФ}/C_{ДНК}$) (см. рис. 6). Спектры поглощения и КД не меняются во времени. Аналогичные кривые были получены ранее для производного феноксазона, содержащего в своём составе остатки -бензо(18-краун-6), не образующего агрегационных форм в водно-солевых растворах и взаимодействующего с ДНК в виде димеров или мономеров в зависимости от соотношения молярных концентраций лиганда и ДНК [6]. Такое спектральное поведение КФ свидетельствует о практическом отсутствии свободного лиганда в растворе при $0.05 < C_{КФ}/C_{ДНК} < 1.0$ и, следовательно, о большом сродстве КФ к ДНК в растворах КСl. Кроме того, можно сделать вывод, что КФ в этих условиях связывается с ДНК аналогично другим производным актиноцина в виде димеров и мономеров.

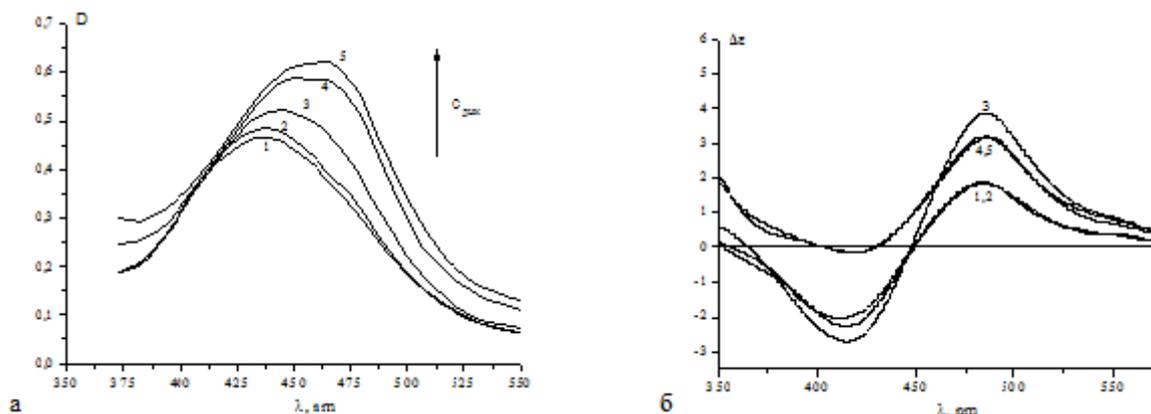


Рисунок 6 – Спектры поглощения (а) и КД (б) КФ в присутствии различной концентрации ДНК в растворах КСl, $C_{КФ} = 10^{-5}$ М, $C_{КФ}/C_{ДНК} = 1.0(1); 0.8(2); 0.6(3); 0.1(4); 0.05(5)$

Процесс связывания КФ с ДНК в растворах NaCl происходит совершенно иначе. В присутствии ионов Na^+ спектры поглощения и КД растворов КФ, содержащих ДНК, изменяются во времени независимо от ее концентрации. От соотношения концентраций $C_{КФ}/C_{ДНК}$ зависит форма начального спектра. На рисунке 7 в качестве примера изображены изменения во времени спектров поглощения (а) и КД (б) раствора КФ при $\mu = 0.01$ и $C_{КФ}/C_{ДНК} = 0.15$. Форма начальных спектров поглощения и КД указывает на быстрое образование двух спектрально различных форм КФ - КФ в составе комплекса с ДНК и Н-формы, образованной свободным КФ. Через некоторое время доля КФ, образующего Н-форму возрастает за счет уменьшения доли связанного с ДНК КФ. Затем в спектре поглощения появляется длинноволновая полоса, соответствующая образованию J-формы. Параллельно изменяется форма и увеличивается интенсивность спектров КД. Длительность этого процесса зависит как от μ , так и от $C_{ДНК}$.

Можно предположить, что в присутствии ионов Na^+ и ДНК в растворе параллельно идут два процесса – образование комплекса КФ с ДНК и формирование агрегатов свободными молекулами КФ.

