

*На правах рукописи*

**Мочалов Константин Евгеньевич**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА ТОПОТЕКАН – ДНК  
МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО И  
ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СОВМЕСТНО  
С ДРУГИМИ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.**

01.04.05 – Оптика

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук**

*Автор:*



Москва 2002

Диссертация выполнена в Институте Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук. (г.Москва).

Научные руководители: доктор физико-математических наук, профессор  
Ю.А. Быковский (МИФИ)  
кандидат физико-математических наук  
В.А. Олейников (ИБХ РАН)

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
А.Б. Баранов (ФГУП ВНИИ Государственный  
оптический институт им. С.И. Вавилова,  
г. Санкт-Петербург).  
доктор химических наук  
С.Ю. Зайцев (МГАВМиБ)

Ведущая организация: Московский Государственный Университет  
им. М.В. Ломоносова.

Защита диссертации состоится “25” сентября 2002 г. в 15 часов  
на заседании диссертационного совета Д.212.130.06 при Московском  
инженерно-физическом институте (государственном университете) по  
адресу:

115409, Москва, Каширское шоссе, 31, т. 324-84-98, 323-91-67

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИФИ.

Автореферат разослан “8” августа 2002 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д.212.130.06

С.Р. Кельнер

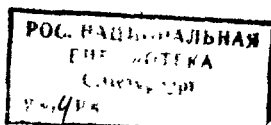
## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Решение фундаментальных и прикладных задач современных наук о жизни требует применения мультидисциплинарных подходов, основанных на комбинации методов биохимии, молекулярной биологии и генной инженерии с физическими методами структурно-функционального исследования биологических молекул и сверхмолекулярных комплексов.

Несмотря на то, что применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасной спектроскопии (ИК) и спектроскопии кругового дихроизма (КД) стало достаточно традиционным в биологических исследованиях, задача совмещенного применения этих методов, равно как и их эффективное сочетание с биологическими подходами используется недостаточно. Более того, расшифровка человеческого генома и связанный с этим потенциал решения многих проблем на уровне индивидуальных генов и других биологических молекул делает крайне актуальной разработку новых либо применение известных, но мало эксплуатируемых в науках о жизни физических методов. Эти методы позволяют проводить изучение сверхмолекулярных комплексов и динамику взаимодействий между индивидуальными молекулами в физиологических условиях. Например, спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР), гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) и линейного дихроизма в потоке (ЛДП) хорошо известны в физических исследованиях, но недостаточно эксплуатируются в биологии.

Настоящая работа посвящена разработке комплексного подхода для исследования межмолекулярных взаимодействий известного противоопухолевого соединения топотекана (ТРТ), активно применяющегося в химиотерапии рака яичника и рака прямой кишки. Топотекан является ингибитором ядерного фермента топоизомеразы I, взаимодействующим с ДНК и со сконструированными методами молекулярной биологии



специфичными и неспецифичными ДНК-субстратами – олигонуклеотидами. Актуальность работы заключается в (1) разработке комплексного подхода использующего современные физические методы оптической спектроскопии применимые в физиологических условиях и, в (2) получении структурно-функциональных данных по взаимодействию ТРТ со своей первичной мишенью, позволяющих выработать рекомендации по направленному синтезу новых противоопухолевых соединений этого класса.

### **Цель работы**

Двумя основными целями данной работы являлось :

- (1) Разработка физико-биологического комплексного подхода к исследованию взаимодействий противоопухолевого соединения в сверхмолекулярных комплексах в физиологических условиях.
- (2) Построение модели взаимодействия ТРТ и ДНК с целью определения молекулярных групп, участвующих в этом взаимодействии и выработки рекомендации по направленному синтезу новых противоопухолевых препаратов этого класса.

### **Научная новизна**

В данной работе впервые:

- Разработан метод селективной регистрации молекулярных взаимодействий молекул ТРТ в сверхмолекулярных комплексах. Описанный в работе подход может быть полностью применен к подобному анализу других соединений камптотецинового класса.
- Идентифицированы молекулярные детерминанты ТРТ и ДНК ответственные за образование устойчивого комплекса.
- Экспериментально доказана гипотеза об участии нескольких молекул ДНК при образовании комплекса с топотеканом.

### **Практическая ценность**

- Полученная в работе интерпретация спектров КР и ГКР топотекана может быть использована для исследования других комплексов с участием этого препарата, а также для исследования комплексов других соединений этого класса
- Идентификация молекулярных детерминант ТРТ определяющих образование его комплексов с ДНК дает указание на возможные места модификации структуры молекулы с целью изменения параметров образуемых комплексов и направленного синтеза новых противоопухолевых соединений этого класса.
- Полученные данные о структуре комплекса ДНК/топотекан являются определяющими для понимания механизмов участия ТРТ в образовании тройных комплексов ТРТ/ДНК/ДНК-топоизомеразы I человека. При этом ДНК-топоизомеразы I человека – фермент, играющий ключевую роль в процессах репликации и транскрипции, и его ингибирование вызывает программируемую смерть раковых клеток (апоптозис).

### **Практическая реализация**

- На основании полученных экспериментальных спектров КР и результатов теоретического расчета определен набор спектральных признаков, характеризующих основные физико-химические состояния молекулы ТРТ в растворе, а также участие функциональных групп ТРТ в межмолекулярных взаимодействиях.
- Методом спектроскопии ГКР получены спектральные признаки образования димеров ТРТ. Разработанный метод позволяет определить процентное содержание димерной формы ТРТ в растворе.
- Методами спектроскопии ЛДП и КД определено пространственное положение молекулы ТРТ, связанной с ДНК. Показано, что угол между плоскостью хромофоров ТРТ и осью ДНК составляет  $55^\circ$ .

- На основании анализа данных, полученных методами спектроскопии КР, наведенного КД и ЛДП установлена предпочтительность связывания ТРТ в малой бороздке ДНК в областях, обогащенных парами G-C.
- Методом спектроскопии КР получено прямое доказательство стабилизации лактонной формы ТРТ при образовании комплекса с ДНК в растворе. Установлено, что связывание с ДНК происходит за счет образования водородных связей, в которых участвуют группы C20-OH и C21=O ТРТ и группа NH<sub>2</sub> гуанина.
- Методом спектроскопии ГКР доказано, что образование комплекса ДНК/ТРТ провоцирует образование димеров ТРТ. Определено, что при концентрациях  $[ДНК]/[ТРТ]=3,5 \cdot 10^{-4}/1,4 \cdot 10^{-5} М$  около 30% молекул ТРТ находятся в димерной форме.
- На основании полученных экспериментальных данных и учета литературных сведений предложена модель межмолекулярного взаимодействия, объясняющая образование комплексов, содержащих две или более молекул ДНК.

### **Апробация работы**

Результаты проведенных исследований опубликованы в пяти статьях в рецензируемых журналах, а также были представлены в докладах на конференциях:

1. XXV European Congress on Molecular Spectroscopy, Coimbra University, Coimbra, Portugal, 2000.
2. International Conference on Topoisomerases in Cancer, Athens, Greece, May-June 2001.
3. XIV Зимняя Международная Молодежная Научная Школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2002.
4. Научная сессия МИФИ-2002, Москва, 2002

### **Тезисы к защите**

1. На основе метода спектроскопии КР разработан метод, позволяющий определять участие реакционно-способных групп ТРТ в ряде взаимодействий, а также степень гидролиза лактонного кольца этой молекулы.
2. На основе спектроскопии ГКР разработан метод определения процентного состава димерной формы ТРТ в растворах низкой концентрации.
3. Методами спектроскопии КД, ЛДП и КР показано, что при образовании комплекса с ДНК топотекан связывается в малой бороздке ДНК на участках, обогащенных парами G-C. Установлено, что угол между основной осью ДНК и плоскостью хромофоров ТРТ составляет 55°.
4. На основании интерпретации и анализа, данных спектроскопии КР и ГКР предложена модель образования комплекса ДНК/ТРТ. Выявлены группы ТРТ и ДНК принимающие участие в образовании комплекса.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения четырех глав и раздела, в котором сформулированы основные выводы. Материалы изложены на 150 страницах, содержат 30 рисунков и 3 таблицы. Список литературы состоит из 122 наименований.

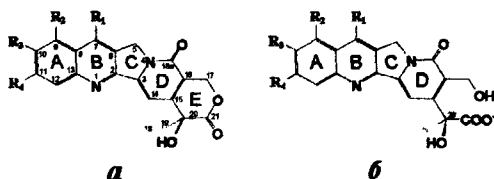
### **Принятые сокращения**

Комбинационное рассеяние – КР, гигантское комбинационное рассеяние – ГКР, круговой дихроизм – КД, линейный дихроизм в потоке – ЛДП, топотекан – ТРТ, дистамицин А – ДСТ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность темы, дается общая характеристика работы и формулируется ее цель.

В первой главе проводится обзор литературы, в котором в краткой форме изложены основные сведения, касающиеся теории и практического применения спектроскопии КР и ГКР. Дается краткое описание противоопухолевых препаратов, производных камптотецина (Рис. 1) и принципов ингибирования действия ДНК – топоизомеразы I человека, приводятся физико-химических параметры ТРТ.



Соединение	R1	R2	R3	R4
7-этил-10,11-метилендиоксикамптотецин	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>	
7-хлорметил-10,11-метилендиокси-камптотецин	CH <sub>2</sub> -Cl	H	CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>	
10,11-метилендиокси-камптотецин	H	H	CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>	
SN38	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	H	ОН	H
9-аминокамптотецин	H	NH <sub>2</sub>	H	H
Камптотецин (СРТ-11)	H	H	H	H
Топотексан	H	CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	ОН	H

- а) Лактонная форма молекулы  
б) Карбоксилатная форма молекулы

Рисунок 1.

Химическая структура молекул камптотецинового класса

Во второй главе описываются используемые экспериментальные методики, приводится схема спектрометра для получения спектров КР, ГКР и ЛДП (Рис. 2). Приводится список используемых материалов, источники их получения и способы приготовления исследуемых образцов.



Третья глава посвящена экспериментальному и теоретическому отнесению спектров КР ТРТ. В первой ее части проводится расчет значений и формы нормальных колебаний молекулы ТРТ посредством решения обратной колебательной задачи. Значения частот колебаний, полученные решением прямой колебательной задачи, сравниваются с частотами полученными экспериментально, после чего уточняются значения силовых констант и прямая колебательная задача решается снова.

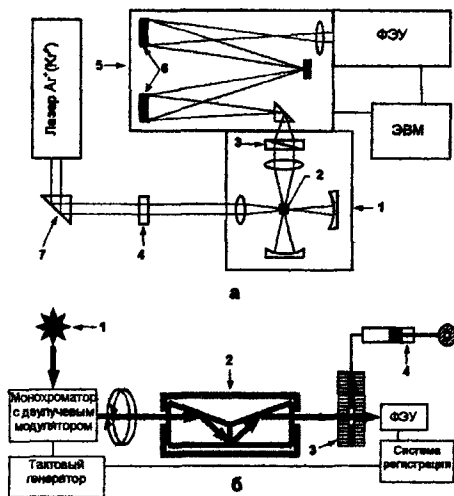


Рисунок 2.

а) Схема установки для получения спектров КР и ГКР.

(1) Кюветное отделение с фокусирующей системой и объективом. (2) Кювета (3) Поляризатор (4) Интерференционный плазменный фильтр на 514,5 либо на 647,1 нм. (5) Двойной монохроматор (6) Дифракционные решетки. (7) Призма, используемая для изменения направления поляризации лазерного излучения.

б) Схема установки для получения спектров ЛДП.

(1) Источник света (2) Призма Френеля. (3) Кювета. (4) Насос.

Вычисление частот и определение формы нормальных колебаний проводили с помощью программного пакета LEV, разработанного под руководством чл.-корр. РАН, проф., д.ф.-м.н. Л.А.Грибова, Институт Геохимии и Аналитической Химии им. В.И. Вернадского РАН. Показано, что большинство нормальных колебаний представляют собой совместные колебания практически всей кольцевой системы ТРТ. На Рис.3 представлена форма некоторых нормальных колебаний. Полученные с помощью расчетов данные сопоставляли с экспериментально наблюдаемыми линиями в спектре КР ТРТ.

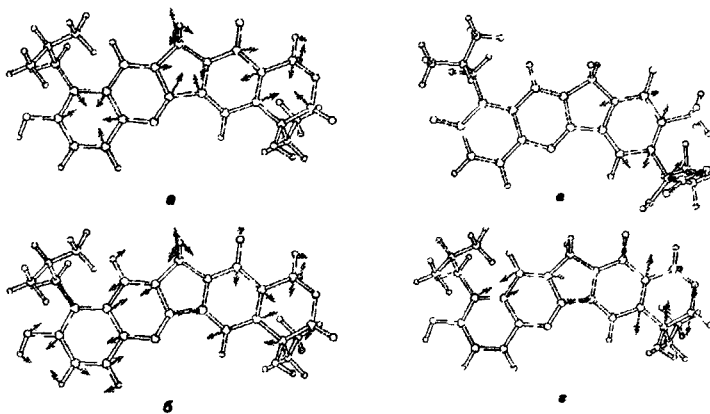


Рисунок 3.

Форма нормальных колебаний, рассчитанных с помощью программного пакета LEV. Приведены колебания соответствующие полосам в спектрах КР около:  $1400\text{ см}^{-1}$  (а);  $1442\text{ см}^{-1}$  в случае лактонной формы ТРТ и  $1423\text{ см}^{-1}$  в случае карбоксильной формы ТРТ (б);  $1515\text{ см}^{-1}$ , появляется только в случае в случае карбоксильной формы ТРТ (в);  $1545\text{--}1558\text{ см}^{-1}$  (г).

В основе экспериментального отнесения спектров КР ТРТ лежит анализ спектров этого вещества в растворе при дейтерировании и изменении рН (рD) раствора. При этом были рассмотрены процессы гидролиза лактонного кольца и депротонирования гидроксильных групп ТРТ и выявлены спектральные изменения соответствующие этим процессам. В результате

основные спектральные линии ТРТ были отнесены, а так же определены спектральные маркеры, характеризующие участие в возможных межмолекулярных взаимодействиях различных частей молекулы ТРТ.

На Рис.4 показан спектр КР ТРТ в водном растворе. На основании анализа данных, приведенных на этом рисунке, удалось установить спектральные признаки, характеризующие гидролиз лактонного кольца ТРТ и возможное участие группы С10-ОН (Рис.1) в образовании водородных связей. Для обнаружения спектральных признаков участия группы С20-ОН в образовании водородных связей были записаны спектры КР ТРТ в D<sub>2</sub>O при экспериментальных условиях аналогичных записи спектров КР в Н<sub>2</sub>O. Ниже приводится интерпретация наблюдаемых спектральных полос ТРТ, основанная на экспериментальных данных и результатах расчетов:

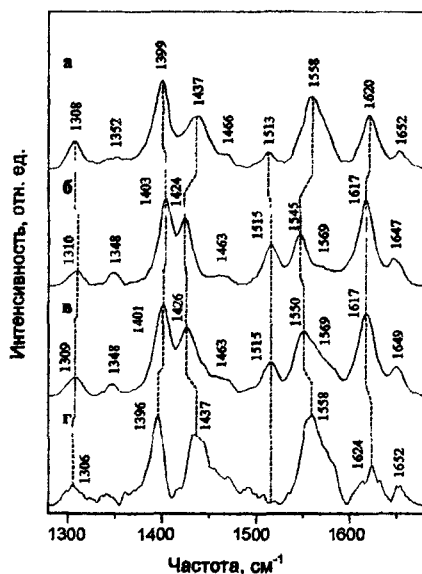


Рисунок 4.

Спектры КР водных растворов ТРТ: лактонная форма молекул ТРТ, рН = 4,5 (а), карбоксильная форма молекул ТРТ, рН = 7,5 (б); водный раствор ТРТ при рН = 6,8 (в); дифференциальный спектр, полученный вычитанием спектра ТРТ в карбоксилатной форме из спектра водного раствора ТРТ при рН = 6,8 (г) Концентрация ТРТ: 10<sup>-3</sup>М Длина волны возбуждающего лазерного излучения: 647 нм. Спектры карбоксильной формы (б) и водного раствора ТРТ (в) уменьшены в 3 раза

### ***Полоса в области 1396-1405 см<sup>-1</sup>.***

Положение этой полосы зависит от формы молекулы: при переходе из лактонной формы в карбоксильную полоса смещается в высокочастотную область на 4-5 см<sup>-1</sup>. Дейтерирование гидроксильных групп ТРТ дает заметно меньшее смещение (1-2 см<sup>-1</sup>). Изменение места присоединения бокового заместителя от С9 (в ТРТ) к С7 (в СРТ-11 и SN-38, Рис. 1) приводит к смещению этой полосы в сторону низких частот на 10 см<sup>-1</sup>. Сопоставление этих характеристик с результатами теоретического моделирования молекул этого семейства показывает, что этой спектральной полосе соответствуют синфазные дыхательные колебания колец А, С и Е и противофазные им дыхательные колебания колец В и D (Рис. 3а).

Чувствительность положения этой полосы к депротонированию гидроксильной группы при С10 и к дейтерированию одной или обеих гидроксильных групп не позволяет использовать эту полосу в качестве маркера лактон/карбоксильного перехода.

### ***Полоса в области 1424-1437 см<sup>-1</sup>.***

Полоса в этой области присутствует во всех КР спектрах ТРТ, причем ее положение четко коррелирует с формой молекулы: в случае лактонной формы частота этой полосы равна 1437 см<sup>-1</sup>, тогда как для карбоксильной формы характерно положение около 1424 см<sup>-1</sup>. Положение полосы не зависит от дейтерирования гидроксильных групп молекулы и от депротонирования гидроксильной группы при С10. Такое поведение позволяет легко сопоставить ей нормальное колебание, обладающее указанными свойствами. Форма этого колебания, представленная на Рис. 3б, определяется вкладом практически всех атомов кольцевой системы молекулы.

### ***Полоса около 1515 см<sup>-1</sup>.***

Полоса средней интенсивности при 1515 см<sup>-1</sup> наблюдается в спектрах карбоксильной формы ТРТ. В случае лактонной формы ТРТ, интенсивность этой полосы заметно ниже и она смещена к положению 1513 см<sup>-1</sup>.

Депротонирование гидроксильной группы при C10 молекулы ТРТ (Рис. 1) приводит к исчезновению этой полосы.

Расчет показывает наличие в этой области двух спектральных линий, одна из которых характерна только для карбоксильной формы молекулы, и которая, следовательно, соответствует полосе  $1515\text{ см}^{-1}$  (Рис. 3в). Однако, присутствие в спектре КР полосы  $1513\text{ см}^{-1}$ , характерной для лактонной формы молекулы, и зависимость ее интенсивности от состояния гидроксильной группы при C10 не позволяет использовать полосу  $1515\text{ см}^{-1}$  для уверенной идентификации формы молекулы ТРТ.

*Полосы около  $1545\text{ см}^{-1}$  и  $1558\text{ см}^{-1}$ .*

Полосы  $1558\text{ см}^{-1}$  (лактонная форма) и  $1545\text{ см}^{-1}$  (карбоксильная форма) смещаются на  $2\text{-}3\text{ см}^{-1}$  в высокочастотную область при дейтерировании молекулы ТРТ (Рис. 3г). Этот факт, а также независимость положения полосы  $1558\text{ см}^{-1}$  от состояния гидроксильной группы при C10, показывают, что ее источником являются колебания, локализованные вблизи лактонной части молекулы. Чувствительность этих полос к изменениям в лактонной части молекулы не позволяет использовать их для идентификации формы молекулы. Однако если по положению полосы  $1424/1437\text{ см}^{-1}$  установлено, что молекула находится в лактонной форме, смещение полосы  $1558\text{ см}^{-1}$  указывает на участие во взаимодействии водорода гидроксильной группы при C20.

*Полоса в области  $1617\text{-}1626\text{ см}^{-1}$ .*

В случае карбоксильной формы молекулы ТРТ эта полоса проявляется при  $1617\text{ см}^{-1}$ . В случае лактонной формы, положение полосы изменяется как в случае дейтерирования молекулы, так и в случае депротонирования гидроксильной группы при C10. Расчет показывает, что данная полоса включает в себя две спектральные линии, одна из которых вызвана преимущественно колебаниями атомов колец А и В (около  $1617\text{ см}^{-1}$ ), а вторая – атомов кольца D (около  $1624\text{ см}^{-1}$ ). Таким образом, интенсивности

этих линий должны зависеть от локализации  $\pi$ -электронов в области колец А-В или D – хромофоров ТРТ.

В случае карбоксильной формы молекулы, основной вклад дает линия  $1617 \text{ см}^{-1}$ , что и обуславливает независимость ее положения от дейтерирования гидроксильных групп гидролизованного кольца Е. В случае лактонной формы молекулы ТРТ, больший вклад дает линия  $1624 \text{ см}^{-1}$ . Положение и интенсивность этой линии изменяются при дейтерировании гидроксильной группы при С20, а так же зависят от ионного состояния гидроксильной группы при С10 и вызванного депротонированием этой гидроксильной группы смещением  $\pi$ -электронов молекулы в область колец А-В. В спектре КР это проявляется в изменении интенсивности и смещении полосы от  $1620$  к  $1624 \text{ см}^{-1}$ .

Отдельное исследование было проведено для установления спектральных признаков взаимодействия с участием группы  $\text{C21=O}$  ТРТ.

Полоса в области  $1647\text{-}1655 \text{ см}^{-1}$  характерна для колебаний двойных связей  $\text{C=O}$ . В лактонной форме, молекула ТРТ содержит две карбонильные группы, связанные с кольцами D (при атоме С16а) и Е (при атоме С21). Следовательно, полоса в этой области спектра КР молекулы ТРТ определяется двумя модами колебаний, соответствующими каждой из этих групп. Анализ данных приведенных на Рис. 5 показал, что линия  $1646 \text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям карбонильной группы, связанной с кольцом D, а линии  $1653$  и  $1659 \text{ см}^{-1}$  связаны с колебаниями карбонильного кислорода атома С21 кольца Е. Отношение интенсивностей линий  $I_{1653}/I_{1659}$  практически не изменяется с изменением рН раствора и равно  $\approx 2$ . Постоянство отношения указывает на то, что данные две линии являются результатом расщепления одной спектральной полосы. Согласно литературным данным такое расщепление характерно для полосы, относящейся к колебанию карбонильной группы присоединенной к лактонному кольцу. Расщепление является результатом резонанса Ферми между валентным колебанием  $\text{C=O}$  и

второй гармоникой одного из низкочастотных колебаний или комбинации двух низкочастотных колебаний лактонного кольца.

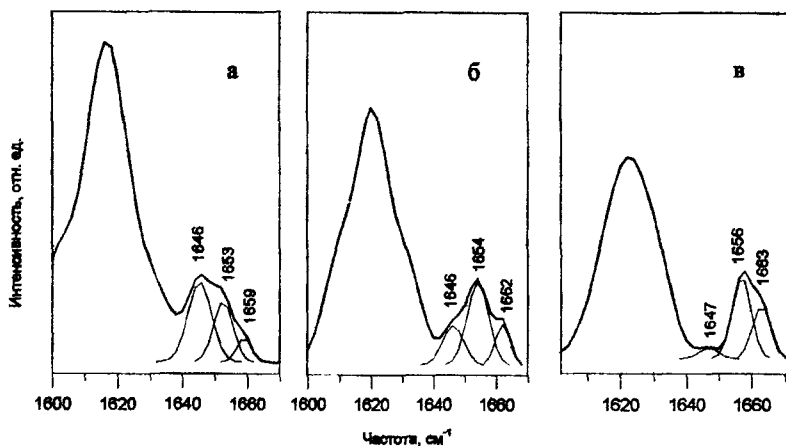


Рисунок 5.

Спектры комбинационного рассеяния ТРТ в области колебаний карбонильных групп. Приведены спектры карбоксильной формы молекул ТРТ, рН = 7,5 (а), ТРТ в водном растворе при рН=4,5 (б) и ТРТ в водном растворе при рН=2,3 (в).

Димеризация молекул ТРТ в водном растворе происходит при достаточно малых значениях концентрации ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$ М), поэтому анализ этого процесса проводился с помощью спектроскопии ГКР. Высокая чувствительность метода ГКР позволила записывать спектры водных растворов ТРТ, начиная с концентрации  $5 \cdot 10^{-7}$  М (тогда как запись спектров КР требует на два порядка более высоких концентраций). На Рис. 6 представлены спектры ГКР растворов ТРТ в диапазоне концентраций от  $5 \cdot 10^{-6}$  до  $5 \cdot 10^{-4}$  М.

Сопоставление зависимости относительной интенсивности полос  $I_{(1530-1540)}/I_{1412}$  и положения полосы в области  $1530 \text{ см}^{-1}$  от концентрации ТРТ с данными, рассчитанными на основе спекрофотометрических измерений, позволило разработать метод определения процентного содержания димерной формы ТРТ в растворе. Полученные калибровочные зависимости приведены на Рис. 7.

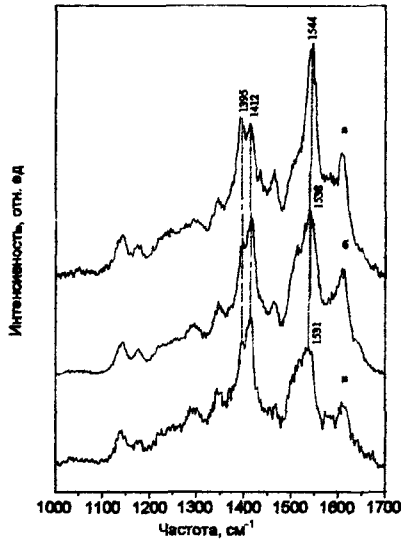


Рисунок 6.

Спектры ГКР водного раствора ТРТ, при концентрациях  $[TPT] = 5 \cdot 10^{-4} M$  (а);  $5 \cdot 10^{-5} M$  (б);  $5 \cdot 10^{-6} M$  (в). Спектры нормированы по интенсивности полосы  $1412 \text{ см}^{-1}$ .

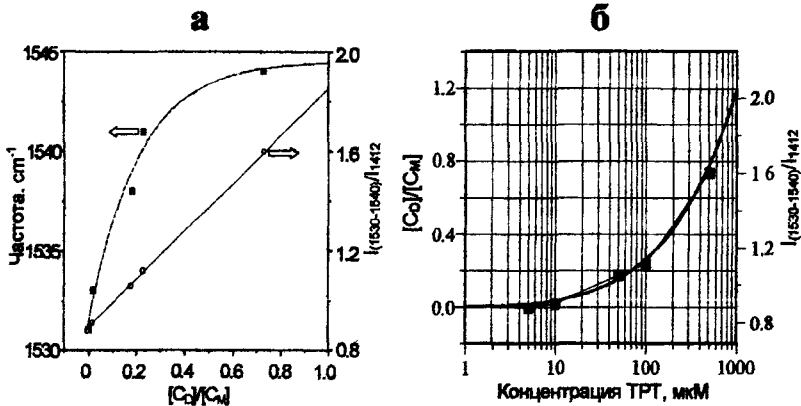


Рисунок 7.

а) Калибровочные зависимости отношение интенсивностей полос около  $1540$  и  $1412 \text{ см}^{-1}$   $I_{1540}/I_{1412}$  (сплошная линия, правая ось) и положение пика около  $1540 \text{ см}^{-1}$  (пунктир, левая ось) как функции величины  $C_D/C_M$ .

б) Корреляция между значениями отношения интенсивностей  $I_{1540}/I_{1412}$  и концентрацией димеров в растворе с общей концентрацией ТРТ. Сплошная линия – результат расчета отношения  $C_D/C_M$  (константа димеризации  $K = 4 \cdot 10^3 M^{-1}$ ), левая ось. Экспериментальные точки – отношения интенсивностей полос около  $1540$  и  $1412 \text{ см}^{-1}$   $I_{1540}/I_{1412}$ , определенные по данным ГКР, правая ось



Четвертая глава посвящена изучению механизмов образования комплекса ДНК/ТРТ с помощью ряда оптических и сопутствующих биологических методов. Измерение линейного дихроизма в потоке (Рис. 8.1) позволило установить, что при связывании ТРТ и ДНК, угол между плоскостью хромофоров ТРТ и плоскостью оснований ДНК составляет  $55^\circ$ .

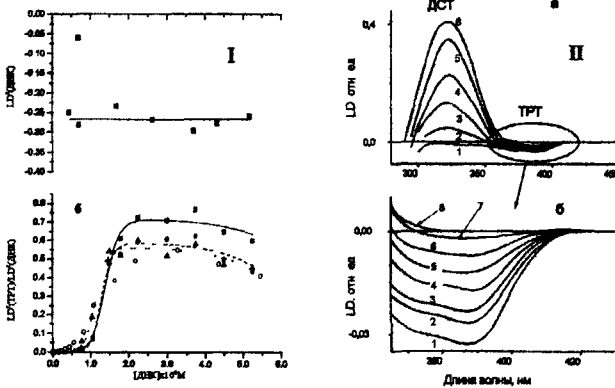


Рисунок 8.

I. Зависимость линейного дихроизма ДНК и ТРТ в комплексе с ДНК от концентрации ДНК а) Приведенный линейный дихроизм ДНК на длине волны 260 нм; б) Приведенный линейный дихроизм ТРТ в комплексе с ДНК на длине волны 390 нм, Сплошная линия (1) – через 2 часа после приготвления комплекса, Пунктирная линия (2) – через 24 часа; Точки (3) – через 48 часов.

II Конкурентное связывание ТРТ и дистамицина А. а) Спектр ЛД комплекса тимусная ДНК/ТРТ при различных концентрациях дистамицина А. Соответствующие кривые даны для соотношений концентраций [ДСТ]/[ДНК]: (1) – 0, (2) – 0,03; (3) – 0,07, (4) – 0,11; (5) – 0,17; (6) – 0,45. Концентрации [ТРТ] =  $1,4 \cdot 10^{-3}$  М, [ДНК] =  $2,25 \cdot 10^{-4}$  М были постоянными б) Увеличенное изображение сигнала ЛД, соответствующее связанному ТРТ, при прочих тех же условиях, что и на панели (а) соответствующие кривые: (1) – 0; (2) – 0,03, (3) – 0,07; (4) – 0,11; (5) – 0,17; (6) – 0,20; (7) – 0,25; (8)–0,45.

Такая величина угла необычна, поскольку для типичных интеркаляторов этот угол больше, а у соединений, связывающихся по малой бороздке, он меньше.

Согласно данным спектроскопии кругового дихроизма сигнал наведенного КД молекулы ТРТ возникает благодаря связыванию этого соединения с ДНК. При этом сопоставление знака наведенного КД и интенсивности этого сигнала с литературными данными указывает на то, что ТРТ не является соединением, связывающимся целиком в малой бороздке, поскольку в этом

случае сигнал должен быть положительным, в то время как, наблюдается отрицательный сигнал КД. С другой стороны ТРТ, вероятно, не является интеркалятором, поскольку интенсивность отрицательного сигнала КД (свойственного интеркаляторам) должна быть, в этом случае, намного больше, чем наблюдается в эксперименте.

Данные спектроскопии ЛДП уверенно свидетельствуют о специфичности ТРТ к последовательностям ДНК с высоким содержанием пар GC: poly(dG-dC)poly(dG-dC) ~ poly(dG)poly(dC) > тимусная ДНК (42% GC-пар) > poly(dA)poly(dT) ~ poly(dA-dT)poly(dA-dT). Исследованное конкурентное связывание ТРТ с известным узкобороздочным лигандом дистамицином А (Рис. 8.П) показало явную предпочтительность связывания ТРТ по узкой бороздке ДНК. Это же подтверждается и большей афинностью ТРТ к ДНК бактериофага Т4 в которой большая бороздка занята остатками α-гликозилированного цитозина, тогда как малая бороздка полностью свободна для взаимодействия с лигандом.

С помощью спектроскопии КР был выявлен ряд общих признаков взаимодействия ТРТ с dG и ДНК (Рис. 9), при существенных отличиях взаимодействия ТРТ с другими нуклеозидами. Обнаружено, что спектры комплексов ТРТ с dA, dT и dC сходны со случаем комплекса с dI и не похожи на комплекс с ДНК.

Основным отличительным признаком взаимодействия ДНК(dG)/ТРТ является стабилизация лактонной формы ТРТ, что является первым прямым определением формы ТРТ в физиологических условиях. Отличие в связывании ТРТ с dG и dI свидетельствует о преимущественной роли группы C2-NH<sub>2</sub> гуанина в образовании связи ДНК/ТРТ, что подтверждает данные спектроскопии ЛДП. Кроме того, согласно данным спектроскопии КР, во взаимодействии ТРТ и ДНК принимают участие карбонильная группа кольца Е и гидроксильная группа при С20 ТРТ. Интересно отметить, что расстояние между атомом водорода группы С20-ОН и атомом кислорода карбонильной группы кольца Е составляет приблизительно 2,5Å и почти совпадает с

расстоянием между водородом аминогруппы и атомом N3 гуанина. Указанные группы гуанина являются, соответственно, донором и акцептором водородных связей в малой бороздке.

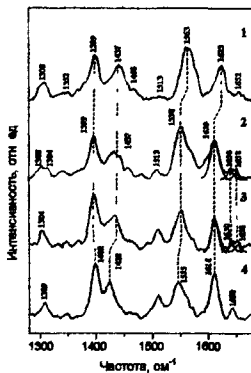


Рисунок 9.

Спектры комбинационного рассеяния: водного раствора ТРТ при  $\text{pH}=4,5$  (лактозная форма) и концентрации  $1,0 \cdot 10^{-4}$  М (1); комплекса ДНК/ТРТ (2); комплекса dG/ТРТ (3); комплекса dI/ТРТ (4).

Соотношение концентраций [ДНК, dG, и dI]/[ТРТ]= $2,3 \cdot 10^{-3}$  М/ $1,0 \cdot 10^{-4}$  М соответственно. Длина волны возбуждения 647,1 нм; Мощность 200мВт.

На основании всех перечисленных экспериментальных результатов можно предположить, что образование связи dG/ТРТ и, в результате, ДНК/ТРТ происходит за счет возникновения пары водородных связей между соответствующими донорами и акцепторами водорода (Рис. 10). Такая пара состоит из: 1) группа C20-OH (ТРТ) и атом N3 гуанина; 2) группа C21=O (ТРТ) и аминогруппой гуанина.

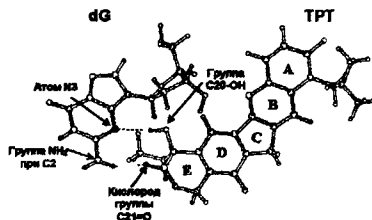


Рисунок 10.

Предполагаемая модель взаимодействия dG и ТРТ Пунктирными линиями отмечены водородные связи.

Спектроскопия ГКР была далее использована для подтверждения гипотезы о формировании комплексов ТРТ/ДНК с участием нескольких молекул ДНК. Очевидно, что для того, чтобы связать между собой хотя бы две молекулы ДНК, с помощью какой-либо структуры составленной из молекул ТРТ необходимо, чтобы у этой структуры имелось два свободных лактонных кольца. Таким условиям удовлетворяют димеры, которые образуются за счет перекрытия хинолиновых частей ТРТ (такая гипотеза выдвигалась в более ранних работах). С другой стороны, имея в наличии надежные спектральные маркеры диммеризации, оказалось не трудно показать, что образование комплекса с ДНК увеличивает в три раза содержание димеров при постоянной концентрации ТРТ (см. Рис.7 и 11).

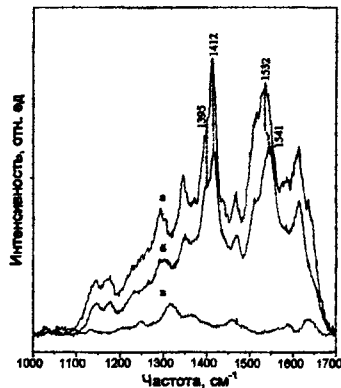


Рисунок 11.

Спектры гигантского комбинационного рассеяния: водного раствора ТРТ при концентрации  $[ТРТ] = 1,4 \cdot 10^{-5}$  М (а); комплекса ТРТ/ДНК при концентрациях  $[ТРТ] = 1,4 \cdot 10^{-5}$  М и  $[ДНК] = 3,5 \cdot 10^{-4}$  М (б), водного раствора ДНК,  $[ДНК] = 3,5 \cdot 10^{-4}$  М (в)  $\lambda_{возб} = 514,5$  нм Мощность излучения 30 мВт В качестве ГКР активной системы использован цитратный гидрозоль серебра.

При этом для насыщенного (весь ТРТ связан) комплекса с концентрациями  $[ТРТ] = 1,4 \cdot 10^{-5}$  М и  $[ДНК] = 3,5 \cdot 10^{-4}$  М 30% наблюдаемых димеров эквивалентны 30% комплексов с участием нескольких молекул ДНК, описанных в более ранних работах. Оставшийся ТРТ также связан с ДНК, но в комплексы, не дающие сигнала ЛД на 390 нм, т.е. с участием одной молекулы ДНК.

Резюмируя, комплекс ДНК/ТРТ может быть представлен следующим образом (Рис. 10, 12):

Молекулы ТРТ связываются в малой бороздке ДНК с группами  $\text{NH}_2$  и атомами N3 гуанина посредством групп C21=O и C20-OH лактонного кольца

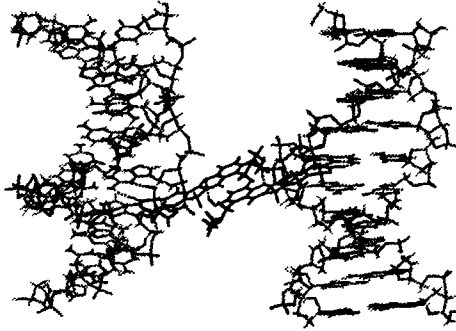


Рисунок 12.

Предполагаемая модель взаимодействия в комплексе ДНК/ТРТ с участием димера ТРТ и двух молекул ДНК. Черным цветом выделен димер ТРТ. Жирными пунктирными линиями отмечены обсуждаемые водородные связи.

(подробнее на Рис. 10). При этом, согласно данным спектроскопии ГКР, около 30% от общего количества комплексов представляют собой структуры типа ДНК/ТРТ/ТРТ/ДНК. В таких комплексах связь ТРТ с ДНК осуществляется, так же как и в первом случае, а хинолиновые фрагменты молекулы ТРТ связываются друг с другом образуя димер. Поскольку из предыдущих работ известно, что ТРТ лучше связывается с нерелаксированной ДНК, то, возможно, описанный механизм связывания соседних спиралей суперскрученной молекулы ДНК димерами ТРТ реализуется в клетке и препятствует релаксации ДНК топоизомеразой I. Таким образом, образование описанного комплекса может служить дополнительным механизмом ингибирования действия ДНК топоизомеразы I человека.

В настоящее время ведутся активные работы по установлению структуры тройного комплекса с участием ДНК, топоизомеразы I и ТРТ.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. К.Е. Мочалов, О.А. Устинова, С.А. Стрельцов, С.Л. Гроховский, А.Л. Жузе, И.Р. Набиев, А.В. Суханова, В.А. Олейников, Спектроскопия комбинационного рассеяния топотекана, ингибитора ДНК-топоизомеразы I, Оптика и спектроскопия, **93**, № 4, 2002.
2. К.Е. Мочалов, С.А. Стрельцов, М.А. Ермишов, С.Л. Гроховский, А.Л. Жузе, О.А. Устинова, А.В. Суханова, И.Р. Набиев, В.А. Олейников, Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния комплексов топотекана с ДНК: связывание с ДНК индуцирует димеризацию топотекана, Оптика и спектроскопия, **93**, № 4, 2002.
3. A. Sukhanova, S. Grokhovsky, M. Ermishov, K. Mochalov, A. Zhuze, V. Oleinikov, I. Nabiev, DNA structural alterations induced by *bis*-netropsins modulate human DNA topoisomerase I cleavage activity and poisoning by camptothecin, *Biochem. Pharmacol.*, **64**, No.1, 2002.
4. V. Oleinikov, A. Sukhanova, K. Mochalov, O. Ustinova, I. Kudelina, I. Bronstein, I. Nabiev, DNA Binding Induces Conformational Transition within the Humane DNA Topoisomerase I in Solution, *Biospectroscopy (Biopolymers)*, **67**, No. 6, 2002.
5. S. Streltsov, A. Sukhanova, A. Mikheikin, S. Grokhovsky, A. Zhuze, I. Kudelina, K. Mochalov, V. Oleinikov, J.-C. Jardillier, I. Nabiev, Structural Basis of Topotecan-DNA Recognition Probed by Flow Linear Dichroism, Circular Dichroism and Raman Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 2001.
6. I. Nabiev, K. Mochalov, O. Ustinova, A. Sukhanova, J.-C. Jardillier, V. Oleinikov, The structure of cleavable ternary complexes of human DNA topoisomerase I, DNA and topotecan in solution probed by Raman and CD spectroscopy, *Anticancer Research*, **21**, No.3A, 2001.
7. V. Oleinikov, K. Mochalov, O. Ustinova, A. Zhuze, S. Streltsov, A. Sukhanova, J.-C. Jardillier, I. Nabiev, Raman spectroscopy study of DNA

- binding by topotecan, inhibitor of DNA topoisomerase I, *Anticancer Research*, **21**, No.3A, 2001.
8. К.Е. Мочалов, О.А. Устинова, Исследование структуры комплекса топотекан-ДНК методом спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния Тезисы XIV зимней международной молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2002.
  9. О.А. Устинова, К.Е. Мочалов, Т.А. Волченкова, Исследование системы Р-гликопротеин/липид методами Ленгмюр-Блоджет и спектроскопии комбинационного рассеяния, Тезисы XIV зимней международной молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2002.
  10. О.А. Устинова, К.Е. Мочалов, В.А. Олейников, Применение спектроскопии комбинационного рассеяния для исследования биологических комплексов, Нучная сессия МИФИ-2002. Сборник научных трудов. В 14 томах. Т.3.М.:МИФИ, 2002.
  11. О.А. Устинова, К.Е. Мочалов, В.А. Олейников, Исследование конформационной зависимости системы Р-гликопротеин/липид методом спектроскопии комбинационного рассеяния, Нучная сессия МИФИ-2002. Сборник научных трудов. В 14 томах. Т.3.М.:МИФИ, 2002.
  12. Т.А. Волченкова, К.Е. Мочалов, О.А. Устинова, В.А. Олейников Самоорганизующиеся ансамбли модельных мембран, содержащие Pgp. - Тезисы 3-ей Международной конференции "Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии", С.-Петербург, Россия, 2001.
  13. V. Oleinikov, K. Mochalov, O. Ustinova, A. Zhuze, S. Streltsov, I. Nabiev, Raman and SERS spectroscopy study of interaction of anticancer drug topotecan with DNA, Abstract of The first international conference on Advanced Vibrational Spectroscopy ICAVS-1, Turku, Finland, 2001.

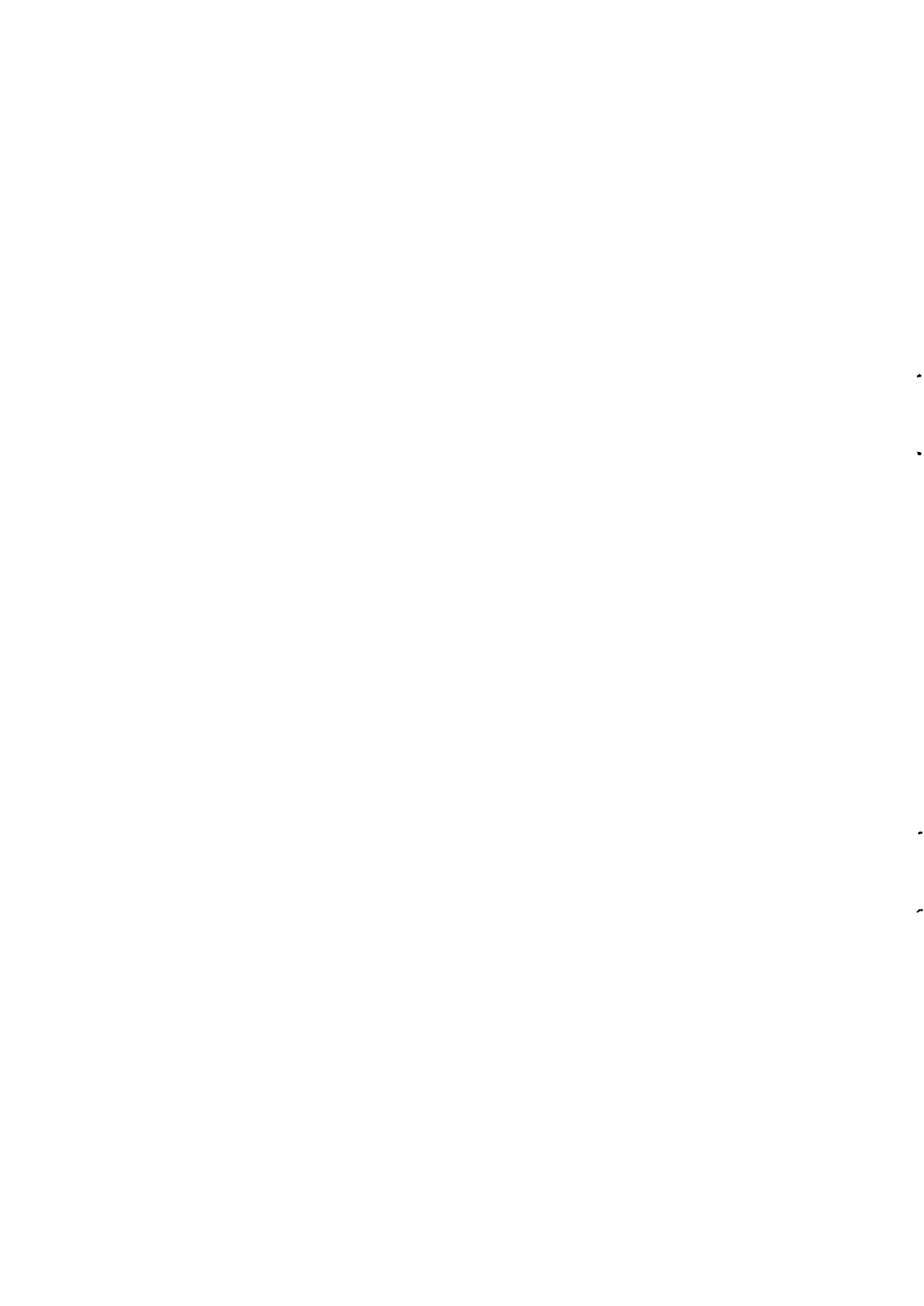
14. O. Ustinova, T. Volchenkova, F. Fleury, K. Mochalov, L. Baggetto, V. Oleinikov, SERS spectroscopy study of verapamil/P-glycoprotein interaction in membrane fraction of MDR cells, Abstract of The first international conference on Advanced Vibrational Spectroscopy ICAVS-1, Turku, Finland, 2001.
15. V. Oleinikov, K. Mochalov, A. Sukhanova, M. Ermishov, S. Streltsov, S. Grokhovsky, A. Zhuze, J.-C. Jardillier, I. Nabiev, Raman spectroscopy of DNA-topotecan complexes, In Proceedings of the 17th International Conference Raman Spectroscopy, 2000, Ed. John Wiley & Sons, Chichester - New York - Weinheim - Brisbane - Singapore - Toronto, 2000.
16. V. Oleinikov, K. Mochalov, A. Sukhanova, M. Ermishov, S. Streltsov, S. Grokhovsky, A. Zhuze, J.-C. Jardillier, I. Nabiev, Raman spectroscopy study of topotecan complexes with DNA and nucleosides, XXV European Congress on Molecular Spectroscopy, Book of Abstracts, Coimbra University, Coimbra, Portugal, 2000.
17. A. Feofanov, K. Mochalov, V. Tarabara, M. Ermichov, I. Nabiev, T. Sergeeva, R. Iakubovskaya, SERS spectroscopy approach to analysis in vivo pharmacokinetics and biodistribution of cobalt octacarboxyphthalocyanine, In Proceedings of the 16th International Conference Raman Spectroscopy, Cape Town, South Africa, Heyns A M., Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
18. K. Mochalov, Preparation and characterization of novel substrates for SERS spectroscopy trace analysis of biological compounds, In Proceedings of the "The 3rd International Engelhard Conference On Molecular Biology", 1997.

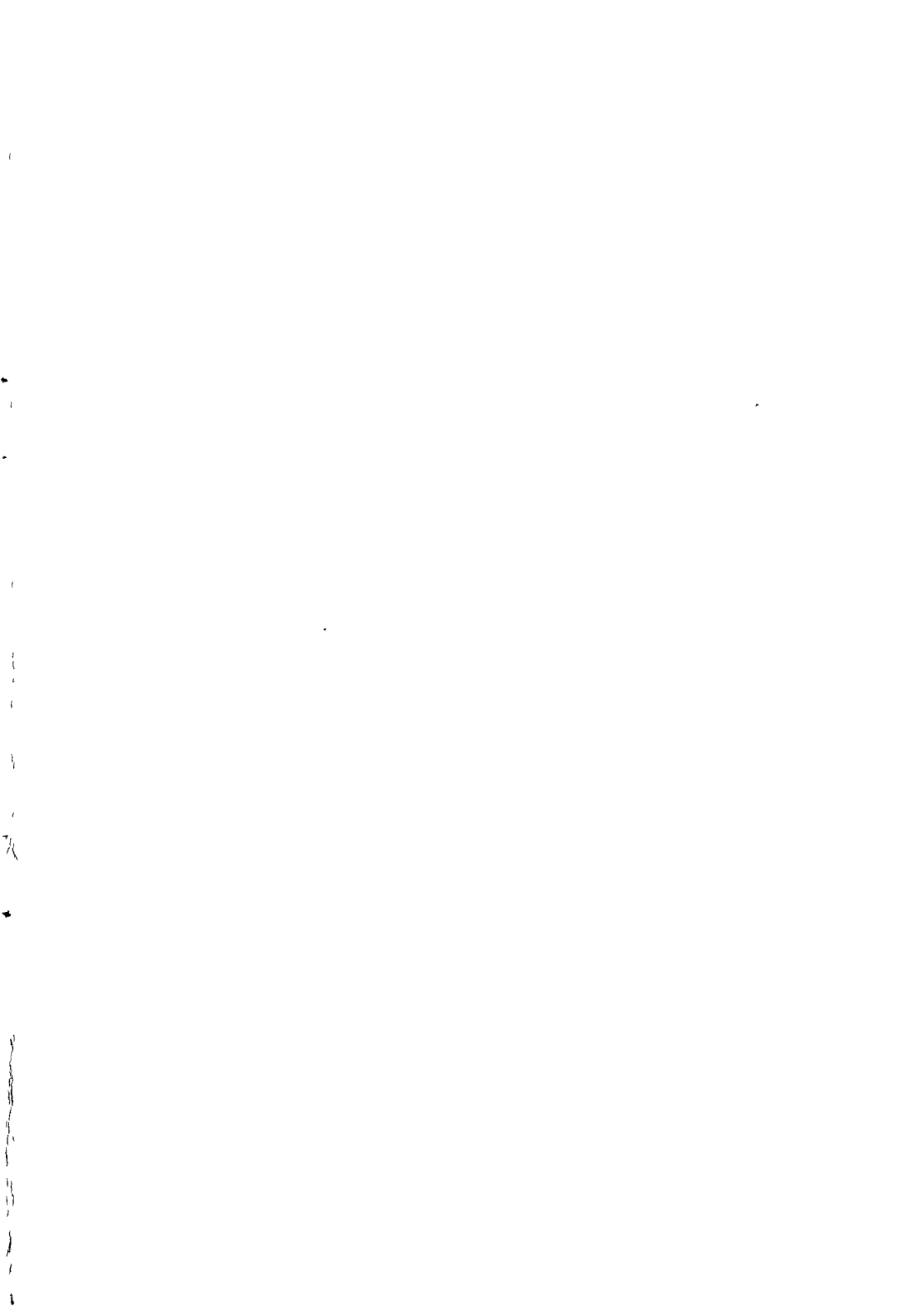


Подписано в печать 17.06.2002 г.  
Формат 60 x 90/16. Объем 1.0 п.л. Тираж 80 экз. Заказ № 30

---

Оттиражировано в ООО «САТУРН мтк»  
111020, Москва, Авиамоторная ул., 11





01.04

РНБ Русский фонд

2004-4

28279



15.11.2002