

# ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЕНОКСАЗОНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ГОМОЛОГИЧНОГО РЯДА С ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДОМ 5'-d(TpGpCpA): АНАЛИЗ МЕТОДАМИ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

Методами двумерной гомоядерной и гетероядерной корреляционной ЯМР-спектроскопии исследовано комплексообразование в водном растворе самокомплементарного дезокситетрануклеотида 5'-d(TpGpCpA) с синтетическими производными противоопухолевого антибиотика актиномицина D с аминоалкильными боковыми цепями различной длины. На основе сравнительного анализа внутри- и межмолекулярных протонных корреляций в спектрах 2D-NOESY и характерных изменений протонных и фосфорных химических сдвигов выявлены особенности связывания тетрамера с исследованными лигандами. Определена специфика интеркаляции Act II, Act III и Act IV в терминальный d(TpG)-сайт дуплекса, рассчитаны пространственные структуры молекулярных комплексов.

## ВВЕДЕНИЕ

Феноксазоновый антибиотик актиномицин D (ActD) широко используется в клинической практике для лечения ряда злокачественных опухолевых заболеваний. Молекулярный механизм терапевтического действия ActD обусловлен интеркаляционным связыванием молекул антибиотика с двухспиральной ДНК, что приводит к ингибированию ДНК-зависимого синтеза РНК.

Методами рентгеноструктурного анализа и корреляционной ЯМР-спектроскопии показано, что молекулы ActD встраиваются в двойную спираль ДНК со стороны малой бороздки, при этом плоская система сопряженных колец феноксазонового хромофора располагается между плоскостями пар оснований параллельно их продольной оси. Антибиотик обладает высокой специфичностью связывания с 5'-d(GpC)-сайтом нуклеотидной последовательности. Исследования комплексообразования ActD с олигонуклеотидами показали, что возможно образование двух типов интеркаляционных комплексов антибиотика с дуплексом ДНК, которые отличаются противоположной ориентацией асимметричного феноксазонового хромофора между парами оснований. В остальном, характеристики этих двух типов комплексов ActD с олигонуклеотидным дуплексом оказались довольно сходными. Это указывает на незначительное влияние гидрофобных взаимодействий боковых групп ActD в малом желобе на специфичность связывания лиганда с d(GC)-сайтом двухспиральной ДНК.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Синтетические производные актиномицина D с аминоалкильными боковыми цепями различной длины Act II, Act III и Act IV (рисунок 1) были получены согласно методике, описанной в работе [1]. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфат d(TpGpCpA) синтезирован компанией "Oswel DNA Service" (Великобритания). Феноксазоновые производные и тетрамер лиофилизовали из D<sub>2</sub>O с изотопной чистотой 99,95 % D ("Sigma") и растворяли в водно-солевом растворе (0,1 М NaCl), содержащем 10<sup>-4</sup> моль/л ЭДТА. Двумерные корреляционные гомоядерные (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) (2D-TOCSY, 2D-NOESY) и гетероядерные (<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P) (2D-NMBC) ЯМР-спектры измерены на импульсном спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц при различных соотношениях концентраций лиганда и дезокситетрануклеотида в водно-солевом растворе. Первоначально были измерены ЯМР-спектры (2D-TOCSY и 2D-NOESY) водно-солевого раствора

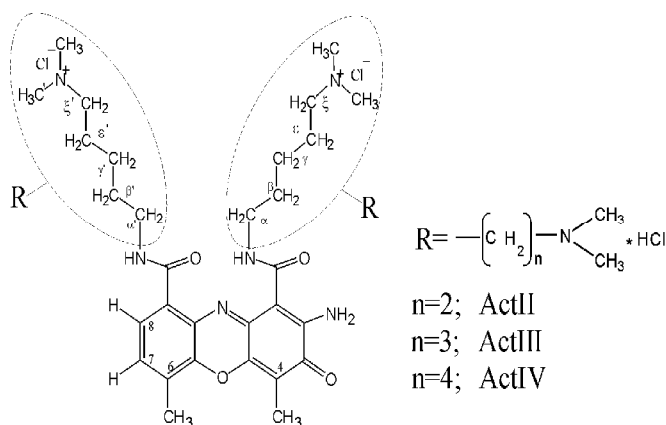


Рисунок 1 - Структурные формулы синтетических феноксазоновых соединений Act II-Act IV

(0,1 М NaCl) дезокситетрануклеотида d(TGCA) и сделано полное отнесение резонансных сигналов необменивающихся протонов тетрамера, которое хорошо согласуется с результатами отнесения для

образцов тетрамера в 0,1 М фосфатном буфере. В дальнейшем проводили двумерные корреляционные ЯМР-эксперименты (2M-TOCSY и 2M-NOESY) со смешанными растворами (0,1 М NaCl) дезокситетрануклеотида и ActII+ActIV. Протонные химические сдвиги измеряли относительно внутреннего стандарта - ТМА (бромид тетраметиламмония) и затем пересчитывали относительно сигнала ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислота). Химический сдвиг ядер фосфора  $^{31}\text{P}$  определяли относительно резонансного сигнала фосфора внешнего стандарта. В качестве примера на рисунке 2 приведен 2M-NOESY спектр раствора дезокситетрануклеотида 5'-d(TpGpCpA) и ActIII.

Пространственные структуры интеркалированных комплексов дезокситетрануклеотида d(TpGpCpA) с синтетическими феноксазоновыми антибиотиками были рассчитаны методами молекулярной механики с помощью программы XPLOR [2]. Для описания атомных взаимодействий использована параметрическая система CHARMM22 [3]. Стартовые конфигурации комплексов были получены с помощью процедур программы XPLOR путем помещения лиганда между парами оснований терминального дуплекса тетрамера в конформации классической В-формы ДНК. Каждая олигонуклеотидная цепь содержала ОН-группы с 5'- и 3'-концов. Топология и параметризация атомных взаимодействий для феноксазоновых антибиотиков была разработана с использованием программы XPLO2D.

Водно-ионное окружение в исследованных молекулярных системах моделировалась 1100 молекулами воды и необходимым количеством противоионов  $\text{Na}^+$ , размещенными в прямоугольном боксе. Топология и параметризация молекул воды соответствовали модели TIP3P [4]. Оптимизация геометрии исследуемых комплексов осуществлялась путем минимизации потенциальной энергии молекул, а также с использованием процедур "отжига" от высокой (600 - 700 К) до комнатной температуры. Визуализация расчетных структур исследуемых молекулярных систем выполнялась с помощью программы VMD [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее проведены систематические исследования биологической активности и закономерностей изменения структурных и энергетических параметров связывания ActII+ActIV с фрагментом ДНК по мере увеличения числа метиленовых групп в боковых цепях хромофора [6]. Изучение индуцированного апоптоза и фаз клеточного цикла в лейкемических клетках MOL T-3 человека методом проточной цитофлуориметрии показало, что изменение длины аминокислотной цепи в феноксазоновых производных даже на одну  $\text{CH}_2$ -группу ведет к значительной вариации антиопухолевой активности синтетических феноксазоновых соединений ряда ActII+ActIV [1, 6].

Соотношение интенсивностей кросс-пиков  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  для дезокситетрануклеотида d(TpGpCpA) в спектрах 2M-NOESY растворов тетрамера с ActII+ActIV соответствует межпротонным расстояниям, характерным для *анти*-положения оснований относительно сахарных колец (кросс-пики между протонами H8(pur)/H6(pur) и протонами H2' в нуклеотидах имеют большую интенсивность, чем корреляции между протонами H8/H6 и H1'). Кросс-пики 2M-NOE между протонами H1' и H2' дезоксирибозы, как правило, более интенсивны, чем кросс-пики H1'-H2', что указывает на преимущественную *S*-конформацию (*C2'-эндо*) дезоксирибозных остатков. Аналогичная картина межпротонных 2M-NOE корреляций, характерная для *B*-формы двойной спирали ДНК, наблюдается и в спектре 2M-NOESY раствора дезокситетрануклеотида d(TGCA). Таким образом, связывание ароматических лигандов ActII+ActIV с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) не приводит к коренным конформационным перестройкам тетрамерного дуплекса.

Важную информацию о специфике комплексообразования и структуре молекулярных комплексов в

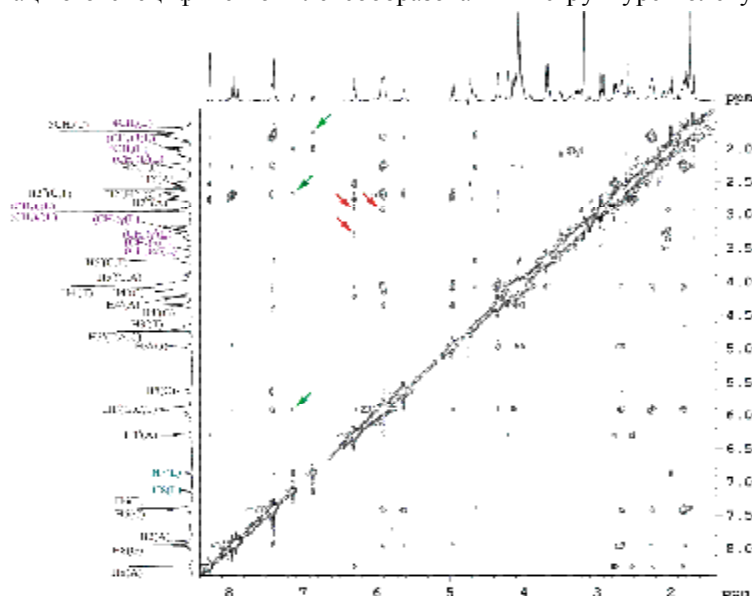


Рисунок 2 - 2M-NOESY спектр (500 МГц,  $\tau_m=200$ мс) смешанного раствора дезокситетрануклеотида 5'-d(TpGpCpA) и ActIII (2,2 мМ/4,9 мМ),  $T=313$  К. В спектре указаны стрелками корреляции между протонами ActIII и нуклеотидов ДНК

растворе дает анализ межмолекулярных кросс-пиков в спектрах 2M-NOESY, так как наличие (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)-NOE-корреляций указывает на то, что расстояние между ними не превышает 0,5 нм. Сравнительный анализ интенсивностей межмолекулярных кросс-пиков 2M-NOE позволяет наложить определенные ограничения в молекулярном комплексе на расстояния между протонами ароматического лиганда и ДНК, что является важным исходным условием корректного построения его молекулярной модели в растворе.

В таблицах 1, 2 представлены результаты такого анализа 2M-NOESY спектров водно-солевых растворов синтетических феноксазоновых производных ActIII-ActIV. Полужирным шрифтом в таблицах выделены обозначения протонов дезокситетрануклеотида для кросс-пиков средней интенсивности, нормальным шрифтом - малой. С увеличением концентрации лиганда число межмолекулярных корреляций 2M-NOE значительно возрастает. Однако при этом следует учитывать и возможное возрастание доли 2:2 комплексов лиганда с тетрамером в растворе, что может усложнить получение структурной информации из ЯМР-спектра. Характерно также и уменьшение числа 2M-NOE-контактов и снижение их интенсивности по мере увеличения длины боковых цепей феноксазонового хромофора, что качественно указывает на уменьшение содержания молекулярных комплексов ароматических лигандов с тетрамером в растворе, обусловленное уменьшением величины равновесной константы комплексообразования в ряду ActII > ActIII > ActIV.

В спектрах 2M-NOESY растворов феноксазоновых производных с дезокситетрануклеотидом d(TGCA) не выявлены разрывы секвенционных межпротонных 2M-NOE-контактов (наблюдаемых обычно в ЯМР-спектре растворов ActD с олигонуклеотидами), по которым можно было бы судить о секвенс-специфичности ароматических лигандов ActII-ActIV. Однако, как можно судить по данным 2M-NOESY, феноксазоновый хромофор с наибольшей вероятностью встраивается между плоскостями пар оснований терминального d(TpG)-сайта, а аминокислотные боковые цепи при этом располагаются в районе малого желоба тетрамерного дуплекса. Анализ изменений положений резонансных сигналов ядер фосфора в гетероядерных (<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P) корреляционных спектрах 2M-HMBC растворов ActIII и ActIV с исследуемым дезокситетрануклеотидом также показал (таблица 3), что лиганды преимущественно интеркалируют в d(TG)-сайт, поскольку для фосфора звена dTp<sub>1</sub>dG тетрамера наблюдается гораздо большее смещение резонансного сигнала в слабое поле в результате добавки в раствор ароматического лиганда по сравнению с другими звеньями. Такое "слабопольное" смещение является еще одним прямым доказательством интеркаляции молекул ActIII и ActIV в d(TG)-сайт тетрамера.

Пространственные структуры интеркалированных комплексов дуплекса дезокситетрануклеотида d(TpGpCrA)<sub>2</sub> с синтетическими феноксазоновыми антибиотиками были рассчитаны методами молекулярной механики с использованием ограничений межатомных расстояний согласно экспериментальным данным ЯМР-спектроскопии. На рисунках 3, 4 представлены соответствующие минимальным потенциальным энергиям пространственные структуры интеркалированных в d(TpG)-сайт комплексов ActIII-ActIV с дуплексом d(TGCA) (для одной из двух возможных ориентаций ароматического лиганда). Пространственная структура комплекса ActIII + d(TpGpCrA)<sub>2</sub> приведена в работе [7].

Таблица 1 – Межмолекулярные 2M-NOE контакты для водного раствора d(TpGpCrA) и ActIII (2 мМ/1 мМ), T = 300 К

| Протон:<br>ActIII | 6CH <sub>3</sub> | H7                                                  | H8                                                   | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>α'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>β'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>γ'</sub> |
|-------------------|------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| dT                | -                | CH <sub>3</sub>                                     | H4 <sub>l</sub>                                      | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | -                                |
| dG                | -                | H1 <sub>l</sub><br>H2 <sub>l</sub> /2 <sub>ll</sub> | H1 <sub>l</sub><br>H2 <sub>l</sub> /2 <sub>ll</sub>  | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | H1 <sub>l</sub>                  | -                                |
| dC                | -                | -                                                   | -                                                    | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | -                                |
| dA                | -                | -                                                   | H1 <sub>l</sub><br>H2 <sub>l</sub> , 2 <sub>ll</sub> | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | H1 <sub>l</sub>                  |
| Протон:<br>ActIII | 4CH <sub>3</sub> | ×                                                   |                                                      | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>α</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>β</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>γ</sub>  |
| dT                | -                | ×                                                   |                                                      | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | -                                |
| dG                | -                | ×                                                   |                                                      | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | -                                |
| dC                | -                | ×                                                   |                                                      | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | -                                |
| dA                | -                | ×                                                   |                                                      | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | H1 <sub>l</sub>                  | -                                |

Таблица 2 – Межмолекулярные 2M-NOE контакты для водного раствора d(TpGpCrA) и ActIV (2 мМ/1 мМ), T = 300 К

| Протон:<br>ActIV | 6CH <sub>3</sub> | H7              | H8  | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>α'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>β'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>γ'</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>ε'</sub> |
|------------------|------------------|-----------------|-----|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| dT               | -                | CH <sub>3</sub> | H4' | -                                | H5', 5''                         | -                                | -                                | -                                |
| dG               | -                | -               | -   | H1 <sub>l</sub>                  | -                                | -                                | -                                | -                                |
| dC               | -                | -               | -   | -                                | -                                | -                                | -                                | -                                |
| dA               | -                | -               | -   | -                                | -                                | -                                | -                                | -                                |
| Протон:<br>ActIV | 4CH <sub>3</sub> | ×               |     | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>α</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>β</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>γ</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>ε</sub>  |
| dT               | -                | ×               |     | -                                | -                                | -                                | -                                | -                                |

|    |   |   |     |   |     |   |     |
|----|---|---|-----|---|-----|---|-----|
| dG | - | × | H1t | - | -   | - | -   |
| dC | - | × | -   | - | -   | - | -   |
| dA | - | × | -   | - | H1' | - | H1' |

Таблица 3 – Отнесение резонансных сигналов ядер фосфора в спектрах 2М-НМВС водного раствора дезокситерануклеотида d(TGCA) (2,2 мМ) и его растворов с лигандом: d(TGCA) - ActIII (2,2 мМ/4,9 мМ) и d(TGCA) – ActIV (2 мМ/3,5 мМ), при  $T=313\text{ K}$

| Система            | d(Tp <sub>1</sub> Gp <sub>2</sub> Cp <sub>3</sub> A) | d(TGCA)-ActIII | d(TGCA)-ActIV |
|--------------------|------------------------------------------------------|----------------|---------------|
| $\delta p_1$       | -0,44                                                | -0,24          | -0,31         |
| $\delta p_2$       | -0,24                                                | -0,16          | -0,26         |
| $\delta p_3$       | -0,24                                                | -0,18          | -0,21         |
| $\Delta\delta p_1$ | ×                                                    | <b>0,20</b>    | <b>0,13</b>   |
| $\Delta\delta p_2$ | ×                                                    | 0,08           | -0,02         |
| $\Delta\delta p_3$ | ×                                                    | 0,06           | 0,03          |

Примечание:  $\Delta\delta p_i = \delta p_i - \delta p_i^*$ , где  $\delta p_i^*$  и  $\delta p_i$  – химические сдвиги ядер фосфора в  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрах водного раствора тетрамера d(Tp<sub>1</sub>Gp<sub>2</sub>Cp<sub>3</sub>A) и его раствора с феноксазоновым производным, соответственно.

Встраивание плоских феноксазоновых хромофоров в дуплекс ДНК существенно изменяет конформационные параметры двойной спирали в сайте интеркаляции. Среднее расстояние между соседними парами оснований в этом сайте в рассчитанных структурах составило около 7Å и угол спирального вращения  $\Omega \sim 25^\circ$ . Интересно, что в кристаллическом комплексе актиномицина D с

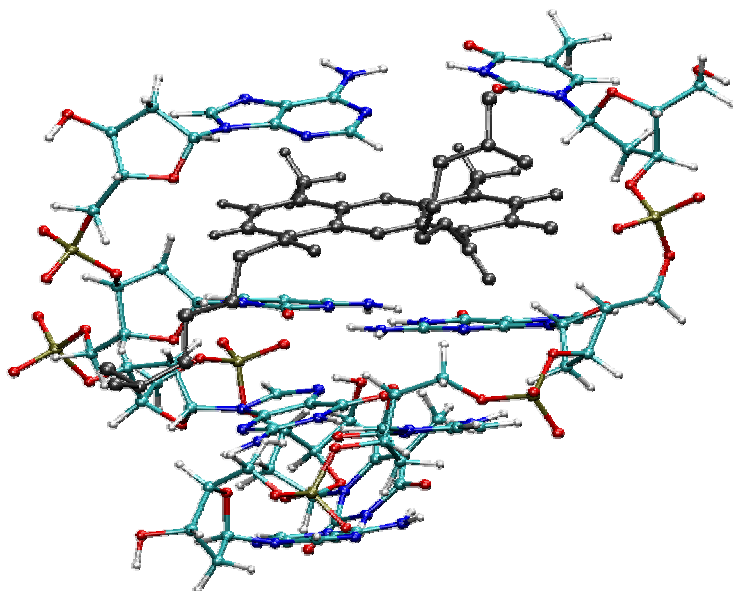


Рисунок 3 - Рассчитанная методами молекулярного моделирования пространственная структура комплекса ActIII с дуплексом тетрамера d(TGCA)<sub>2</sub>

дезоксиолигонуклеотидом угол  $\Omega$  в сайте интеркаляции составил примерно  $3^\circ$  [8]. В комплексах ActII/ActIII/ActIV с 5'-d(TpGpCpA) угол пропеллера терминальной пары оснований Т-А имеет достаточно высокое положительное значение ( $\omega \sim 10^\circ$ - $14^\circ$ ), в то же время наблюдаемое в сайте интеркаляции раскрытие соседних пар оснований Т-А и G-С в направлении большого желобка ( $\rho = -11^\circ$ - $14^\circ$ ) отличается от типичного значения ( $0^\circ$ - $3^\circ$ ) для регулярной спирали ДНК в водно-солевом растворе. Сахарные кольца всех нуклеотидных звеньев в ActII/ActIII/ActIV+d(TpGpCpA)<sub>2</sub> комплексах характеризуются значениями фазового угла псевдотвращения  $P$  в пределах от  $155^\circ$  до  $162^\circ$ , что соответствует C2'-эндо конформации сахаров, как наблюдается для В-формы ДНК. Гликозидные углы  $\chi$  варьируют от  $235^\circ$  до  $270^\circ$ , соответствуя анти-конформации азотистых оснований относительно сахарных колец для всех звеньев нуклеотидной цепи.

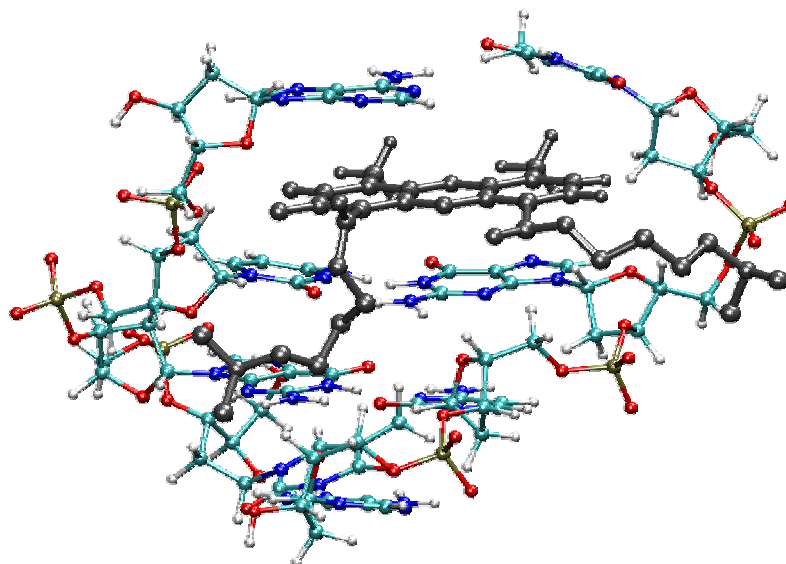


Рисунок 4 - Рассчитанная методами молекулярного моделирования пространственная структура комплекса ActIV с дуплексом тетрамера d(TGCA)<sub>2</sub>

В заключение следует подчеркнуть, что межмолекулярные NOE-контакты, наблюдаемые в 2D-NOESY спектрах гомологичной серии синтетических феноксазоновых производных (ActII-ActIV) с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) свидетельствуют об уменьшении связывания при увеличении числа CH<sub>2</sub>-групп в аминоалкильных боковых цепях антибиотиков, что коррелирует с биологической активностью синтетических феноксазоновых хромофоров. Это подтверждает значительное влияние длины боковых цепей интеркаляторов, их заряда и расположения в большом или малом желобке на специфику связывания этих веществ с ДНК. Исследования пространственных структур комплексов ActII-ActIV с 5'-d(TpGpCpA) методами молекулярной механики показали, что различная специфика связывания феноксазоновых производных с олигомером ДНК имеет место вследствие различных способов интеркаляции хромофора и разнообразных пространственных преобразований аминоалкильных боковых цепей в малом желобке дуплекса.

#### **Библиографический список**

1. Veselkov A.N. Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. — SevNTU Press, 2002. — 259 p.
2. Brunger A.T. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR / A.T. Brunger. — Yale: Univ. Press, 1992. — 382 p.
3. MacKerell Jr. A.D. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: Application to Molecular Dynamics Simulations of DNA and RNA in Solution / Jr. A.D. MacKerell, N. Banavali // J. Comp. Chem. — 2000. — V. 21. — P. 105–120.
4. Jorgensen W. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. Jorgensen, J. Chandrasekhar and others // J. Chem. Phys. — 1983. — V. 79. — P. 926–935.
5. Humphrey W. VMD - Visual Molecular Dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // J. Molec. Graphics. — 1996. — V. 14.1. — P. 33–38.
6. Structure-activity relationship for synthetic phenoxazone drugs: evidence for a direct correlation between DNA-binding and pro-apoptotic activity / A.N. Veselkov, V.Ya. Maleev, E.N. Glibin and others // Eur. J. Biochem. — 2003. — V. 270. — P. 4200–4207.
7. Веселков К.А. Исследование пространственной структуры интеркалированного комплекса феноксазонового антибиотика актиноцил-бис-(2-диметиламиноэтил) амида с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) методами молекулярной механики с использованием данных 2М-ЯМР спектроскопии / К.А. Веселков, А.В. Семанин и др. // Вест. СевГТУ. — Севастополь, 2004. — Вып. 59. — С. 77–87.
8. Shnomiya M. Structural, physical and biological characteristics of RNA: DNA binding agent actinomycin D / M. Shnomiya, W. Chu and others // Biochemistry. — 1995. — V. 34. — P. 8481–8491.

Поступила в редакцию 14.06.2005 г.