

Взаимодействие блеомицина и его олигонуклеотидных производных с нуклеиновыми кислотами

Д.С.Сергеев, В.Ф.Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии

Сибирского отделения Российской академии наук

630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8, факс (383–2)35–1665

Рассмотрены различные аспекты взаимодействия противоопухолевого гликопептидного антибиотика блеомицина с нуклеиновыми кислотами. Собраны и сопоставлены данные по равновесным параметрам связывания, полученные разными физико-химическими методами. Обсужден вклад N- и C-концевых участков молекулы гликопептида в связывание с ДНК и специфичность ее расщепления. Приведены данные о недавно созданном новом классе соединений — конъюгатах блеомицина с олигонуклеотидами. Показано, что такие конъюгаты, подобно антибиотикам, обладают ДНК-расщепляющей активностью (в том числе в каталитическом режиме) в сочетании с высокой селективностью действия по отношению к выбранной последовательности оснований. Библиография — 267 ссылок.

Оглавление

I. Введение	377
II. Связывание блеомицина с нуклеиновыми кислотами	378
III. Расщепление нуклеиновых кислот блеомицином	386
IV. Блеомициновые производные олигонуклеотидов. Синтез и сайт-специфическое расщепление ДНК	393

I. Введение

1. Краткая характеристика семейства блеомициновых антибиотиков

Открытие и первые исследования семейства блеомициновых антибиотиков принадлежат группе японских исследователей, которые в 1963 г. в культуральной жидкости мутантного штамма почвенной бактерии *Streptomyces verticillus* обнаружили вещество с высокой антибиотической активностью. А уже в 1966 г. был выделен целый ряд близких по структуре соединений, получивших общее название — блеомицины.^{1,2} Эти соединения имеют полезные терапевтические свойства, что послужило основой для их широкого внедрения в клиническую практику. В настоящее время блеомицины являются важными фармацевтическими препаратами, они обладают выраженным и антибактериальным и, что особенно важно, противоопухолевым действиями.^{3–8} Свое основное применение блеомицины нашли в химиотерапии злокачественных опухолей, в частности лимфом и плоскоклеточных карци-

ном.^{9–12} Наряду с высокой противоопухолевой активностью блеомицины относительно малотоксичны, они не оказывают иммунодепрессивного действия и поэтому успешно используются в комбинированной химиотерапии.^{13,14} Применение блеомицинов в клинической онкологии описано в обзорных статьях и сборниках^{13–20}.

Одновременно с практическим использованием блеомицинов началось интенсивное изучение их влияния на клетку. Оказалось, что основной мишенью в клетке для действия антибиотиков блеомицинового ряда является ДНК.^{21,22} Блеомицин вызывает ряд эффектов, которые, как известно, связаны с деградацией ДНК, а именно: потерю способности животных и бактериальных клеток образовывать колонии,⁵ ингибирование синтеза ДНК,^{6,23} возникновение хромосомных aberrаций,²⁴ деградацию внутриклеточной ДНК до кислоторастворимых продуктов,²⁵ освобождение ДНК из ее комплекса с мембранами.²⁶ Это повлекло за собой целую серию исследований, посвященных взаимодействию антибиотика с ДНК, в частности, связыванию блеомицина с ДНК, механизму его действия, необходимым ему кофакторам и т.д. Относительно недавно было обнаружено, что блеомицин способен расщеплять также и РНК. Это важное открытие послужило толчком к дальнейшему изучению механизмов действия антибиотика, основ его биологической активности.

К настоящему времени о блеомицине накоплен большой объем информации, часть которой, касающаяся природы его взаимодействия с ДНК, представлена в этом обзоре.

2. Функциональные домены блеомицинов

С момента выделения индивидуальных блеомицинов началась работа по установлению их структуры, расшифровка которой потребовала применения разнообразных химических и физико-химических методов, в том числе спектроско-

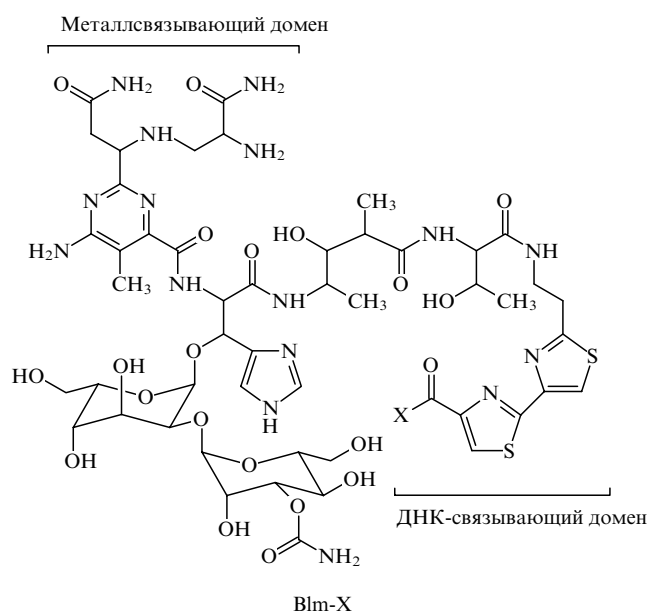
Д.С.Сергеев. Кандидат химических наук, научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот НИБХ СО РАН. Область научных интересов: химия нуклеиновых кислот, производные олигонуклеотидов, антибиотики.

В.Ф.Зарытова. Доктор химических наук, профессор, заведующая того же отдела. Телефон (383–2)39–6224, E-mail: Zarytova@modul.bioch.nsk.su. Область научных интересов: биоорганическая химия, ЯМР-спектроскопия, воздействие на функционирование нуклеиновых кислот.

Дата поступления 28 августа 1995 г.

пии ЯМР и рентгеноструктурного анализа. В общих чертах работа была закончена к 1972 г.²⁷ В 1978 г. структура блеомицина была уточнена,²⁸ а в 1982 г.²⁹ осуществлен полный химический синтез блеомицина A₂.

Блеомицины являются гликопептидами с молекулярной массой ~1500. Общая для всех блеомицинов часть молекулы, носящая название блеомициновой кислоты, состоит из пиримидобламинной кислоты, β-оксигистидина, 4-амино-3-окси-2-метилпентановой кислоты, треонина, 2'-(2-аминоэтил)-2,4'-битазол-4-карбоновой кислоты, связанных пептидной связью, и углеводной части, состоящей из 3-(O-карбамоил)-D-маннозы и L-гулозы, связанной с гидроксильной группой β-оксигистидина. Ниже приведена структура блеомицина (Blm) и C-концевых аминных фрагментов наиболее часто встречающихся блеомицинов. Индивидуальные блеомицины отличаются между собой концевым амином, связанным с карбоксильной группой битазольного остатка. Блеомициновая кислота (Blm-OH) представляет собой соединение, у которого NHX = OH. По составу концевых амина блеомицины делятся на две подгруппы: А и В. Блеомицины подгруппы А содержат в концевом амине первичные и вторичные аминогруппы (за исключением блеомицинов А₁ и А₂). Блеомицины подгруппы В несут гуанидиниевые группировки. Исследования по блеомицину за рубежом выполнены в основном на блеомицине А₂ и бленоксане (смеси блеомицинов А₂ (60–65%), В₂ (30%) и минорных В₄, А₅ и т.д.). В нашей стране в клинической практике и для научных исследований используется блеомицин А₅.



X	Название	Обозначение
NH(CH ₂) ₃ S ⁺ (CH ₃) ₂	Блеомицин А ₂	(Blm-A ₂)
NH(CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₄ NH ₂	Блеомицин А ₅	(Blm-A ₅)
NH(CH ₂) ₃ SCN ₃	Деметилблеомицин А ₂	(DMBlm-A ₂)
NH ₂	Блеомицин В ₂ '	(Blm-B ₂)
NH(CH ₂) ₄ NHC(NH)NH ₂	Блеомицин В ₂	(Blm-B ₂)
NH(CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₃ N(CH ₂) ₄	Блеомицин BAPP	(Blm-BAPP)

Параллельно с определением структуры блеомицинов развивались представления о молекулярных основах их биологической активности. Было установлено, что блеомицин взаимодействует с ДНК и способен к достаточно прочному нековалентному связыванию с ней.^{30–34} Он также образует комплексы с ионами металлов, а в присутствии ионов двухвалентного железа и молекулярного кислорода вызывает деструкцию ДНК.^{35–37} Исходя из этих данных,

молекулу блеомицина условно разделили на участки в соответствии с выполняемой ими функцией.^{38–40} Пиримидобламинная кислота и β-оксигистидин вошли в состав металлсвязывающего домена. Присутствующие на этом участке первичные и вторичные аминогруппы обеспечивают образование прочного комплекса со многими переходными металлами.^{41–44} Остаток битазола и концевой амин X участвуют в связывании с ДНК и носят название ДНК-связывающего домена. 4-Амино-3-окси-2-метилпентановая кислота вместе с треонином обуславливают пространственное взаиморасположение этих двух доменов, необходимое для прочного связывания и успешного расщепления ДНК. И наконец, дисахарид, по-видимому, способствует связыванию молекулярного кислорода для окислительного расщепления ДНК.^{45, 46}

II. Связывание блеомицина с нуклеиновыми кислотами

1. Параметры равновесного связывания

Предположения о том, что блеомицин должен связываться с ДНК, были высказаны еще в 1969 г.,^{30, 33} а год спустя получено первое доказательство связывания меченого три-тием блеомицина А₂ с ДНК *E. coli*.³⁴ Однако систематическое изучение этого процесса с привлечением физико-химических методов началось во второй половине 70-х годов. Удачной находкой для такого исследования оказалось явление тушения флюоресценции блеомицина при связывании с ДНК.³⁸ Блеомицин при возбуждении светом длиной волны 300 нм дает две полосы испускания с максимумами при 353 и 405 нм. Свет с длиной волны 353 нм испускается битазольным остатком и по интенсивности превалирует над испусканием 4-аминопиримидинового кольца при 405 нм. При добавлении ДНК тимуса теленка к раствору блеомицина наблюдалось значительное (до 50%) тушение флюоресценции при 353 нм. Это позволило определить содержание связанного и свободного блеомицина, а при использовании разных концентраций ДНК вычислить кажущуюся равновесную константу связывания (K_b) и число нуклеотидов ДНК на одну связанную молекулу антибиотика (n). Для определения значений K_b и n применялись также методы равновесного диализа,^{47–49} гель-фильтрации,⁴⁹ спектроскопии кругового дихроизма (КД).^{50–52} Данные по K_b и n , полученные разными методами, представлены в табл. 1.

По данным табл. 1 для несодержащего ионов металла блеомицина А₂ значения констант связывания, определенные разными авторами, варьируют в пределах 10^5 – 10^6 л·моль⁻¹. Число пар оснований ДНК на связанную молекулу антибиотика также существенно отличается в работах разных авторов, однако в большинстве работ оно составляет 3–10 пар. При этом нижние значения представляются по последним данным^{52, 55} более достоверными. Повышение ионной силы раствора не меняет K_b , но ведет к увеличению параметра n и, следовательно, к уменьшению числа доступных мест связывания.^{38, 54} Интересно, что связывание блеомицина с гомогенной ДНК poly(dG)·poly(dC) и poly(dA)·poly(dT) по данным работы⁴⁹ оказывается прочнее, чем с гетерогенной, и при этом увеличивается параметр n . Комплексообразование с ионом двухвалентной меди несколько понижает константу связывания и увеличивает число доступных мест связывания.^{49, 57} В то же время комплекс бленоксана с ионом трехвалентного железа имеет в 2 раза большую константу связывания, чем сам бленоксан, с равным числом доступных мест связывания.⁵⁶ Комплексы блеомицина с трехвалентным кобальтом в зависимости от хелатируемого лиганда имеют K_b в пределах от 10^5 до 10^7 л·моль⁻¹ (см.^{50, 59}). Повышение ионной силы раствора существенно уменьшает K_b медных и кобальтовых комплек-

Таблица 1. Параметры равновесного связывания блеомицинов, металлсодержащих блеомицинов и С-концевых фрагментов блеомицина A₂ с ДНК.

Соединение	$K_b \cdot 10^{-5}, ^a$ $л \cdot моль^{-1}$	n^a	Буферные условия	ДНК	Метод определения ^b	Ссылки
Гетерогенная ДНК при низкой ионной силе раствора						
Blm-A ₂	1.2 ± 0.2	11 ± 1	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 2.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	Тимуса теленка	Ф	38
	0.34 ± 0.04	3.4 ± 0.5	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 2.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	Спермы лосося	Ф	53
	7.8 ± 0.5	25 ± 3	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 2.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	Тимуса теленка	Ф	54
	1.0	7.6	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 2.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	То же	Ф	55
Бленоксан ^c	9.3	6	0.8 ммоль · л ⁻¹ цитрат натрия (pH 5.5)	<i>ColEI</i>	Р	47
	4.1	10	1 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0)	Тимуса теленка	Ф	56
Гетерогенная ДНК при ионной силе 25 – 50 ммоль · л ⁻¹						
Blm-A ₂	0.92 ± 0.01	52 ± 4	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 25 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	Тимуса теленка	Ф	38
	3.2	417	15 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 15 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4), 1.5 ммоль · л ⁻¹ EDTA	То же	Ф	57
	8.1	36	50 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 1.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	»	Ф	54
	5.7 ± 0.5	7.4 ± 0.6	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	»	Г	49
	6.8 ± 0.4	7.8 ± 0.4	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄	»	Р	49
	2.5 ± 0.1	6.6 ± 0.6	(pH 7.0)			
Гомогенная ДНК						
Blm-A ₂	26 ± 1	22.8 ± 0.8	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	poly(dG) · poly(dC)	Р	49
	3.9 ± 0.2	9.0 ± 0.6				
	19 ± 1	29.4 ± 0.6	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	poly(dA) · poly(dT)	Р	49
	2.7 ± 0.1	13.2 ± 0.4				
	69.5	19.2	25 ммоль · л ⁻¹ NaCl	poly(dA) · poly(dT)	Ф	58
	0.51	2.7	10 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 6.8)			
Cu(II)Blm-A ₂	87.0	20.4	100 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 10 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 6.8)	poly(dA) · poly(dT)	Ф	58
	0.50	2.6				
Гетерогенная ДНК						
Cu(II)Blm-A ₂	2.3	77	15 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 15 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4), 1.5 ммоль · л ⁻¹ EDTA	Тимуса теленка	Ф	57
	3.9 ± 0.3	5.6 ± 0.4	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	То же	Г	49
	4.4 ± 0.4	5.6 ± 0.4	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	»	Р	49
	1.7 ± 0.1	4.2 ± 0.2				
	18 ± 1	20.2 ± 0.4	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	poly(dG) · poly (dC)	Р	49
	2.6 ± 0.1	8.2 ± 0.6				
Cu(II)Blm-A ₂	10 ± 1	22.0 ± 0.6	25 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄	poly(dA) · poly(dT)	Р	49
	1.7 ± 0.1	12.0 ± 0.6	(pH 7.0)			

Таблица 1 (продолжение)

Соединение	$K_b \cdot 10^{-5}, ^a$ л · моль ⁻¹	n^a	Буферные условия	ДНК	Метод определения ^b	Ссылки
Cu(II)Бленоксан	0.2	8	25 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 7.0)	Тимуса теленка	Ф	48
	0.01	8	50 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0)	То же	Ф	48
	0.012	8	50 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0)	»	Р	48
Fe(III)Бленоксан	9.6	10	1 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0)	»	Ф	56
Fe(III)Blm-A ₂	3.5	5.2	50 ммоль · л ⁻¹ Hepes (pH 7.4)	»	КД	51
Co(III)Blm-A ₂	4.7 ± 0.4	10 ± 2	1 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0), 1 ммоль · л ⁻¹ EDTA	»	Ф	59
	1.5 ± 0.2	10 ± 2	20 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0), 1 ммоль · л ⁻¹ EDTA	»	Ф	59
HO ₂ ⁻ – Co(III)Blm-A ₂	130 ± 30	8 ± 2	20 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0), 1 ммоль · л ⁻¹ EDTA	»	Ф	59
H ₂ O – Co(III)Блен- оксан	500 ± 100	6 ± 2	1 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0), 1 ммоль · л ⁻¹ EDTA	»	Ф	59
	19 ± 3	26 ± 2	140 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 20 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0), 1 ммоль · л ⁻¹ EDTA	»	Ф	59
Cu(II)Blm-A ₅	3	14	15 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 15 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4), 1.5 ммоль · л ⁻¹ EDTA	»	Ф	57
Ni(II)Blm-B ₂	4	—	100 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 10 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 7.5)	12-Звенный дуплекс	КД	52
Трипептид S ^d	1.95 ± 0.04	8 ± 1	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 2.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	Тимуса теленка	Ф	38
	0.59 ± 0.01	35 ± 4	1.2 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 25 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	То же	Ф	38
	4.5	5	1.25 ммоль · л ⁻¹ NaCl, 2.5 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.4)	»	Ф	55
	10	5	0.8 ммоль · л ⁻¹ цитрат натрия (pH 5.5)	<i>ColE1</i>	Ф	47
	1.5	5	2 ммоль · л ⁻¹ Трис–HCl (pH 8.0), 1 ммоль · л ⁻¹ EDTA	То же	Ф	47
Ацетилдипеп- тид ^e	7.5	16	0.1 ммоль · л ⁻¹ EDTA, 10 ммоль · л ⁻¹ какодилат натрия (pH 7.0)	Тимуса теленка	Ф	60
	5	16	0.1 ммоль · л ⁻¹ EDTA, 10 ммоль · л ⁻¹ какодилат натрия (pH 7.0)	poly(dA) · poly(dT)	Ф	60

Таблица 1 (окончание)

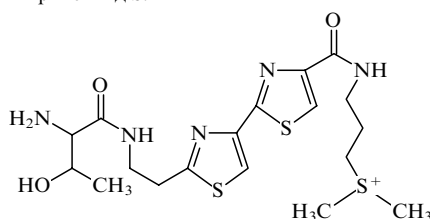
Соединение	$K_b \cdot 10^{-5}$, ^a л · моль ⁻¹	n ^a	Буферные условия	ДНК	Метод определения ^b	Ссылки
Ацетилдипеп- тид	27.0	20.8	25 ммоль · л ⁻¹ NaCl,	poly(dA) · poly(dT)	Ф	58
	0.66	4.8	10 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 6.8)			
	74.9	41.7	100 ммоль · л ⁻¹ NaCl,	poly(dA) · poly(dT)	Ф	58
	0.28	5.0	10 ммоль · л ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH 6.8)			

^a При наличии двух значений первое соответствует сильному, второе — слабому связыванию.

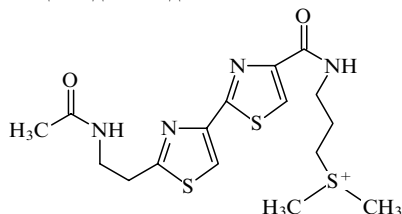
^b Ф — тушение флюоресценции; Р — равновесный диализ, Г — гель-фильтрация, КД — спектроскопия кругового дихроизма.

^c Бленоксан — смесь блеомицина А₂ (60–70%), блеомицина В₂ (30%) и минорных компонентов (блеомицина А₅, блеомицина В₄, деметилблеомицина А₂ и т.д.), используемая как химиотерапевтическое средство.

^d Трипептид S:



^e Ацетилдипептид:



сов блеомицина с ДНК, оставляя неизменным число пар оснований на связанную молекулу,^{48, 59} что свидетельствует о вкладе электростатических взаимодействий в данный процесс.

В настоящее время в литературе почти нет данных о параметрах связывания блеомицина с РНК. Исключением в этом отношении является работа⁶¹, в которой авторы, используя метод тушения флюоресценции, вычислили K_b и n для связывания бленксана с фенилаланиновой тРНК дрожжей. Оказалось, что параметры связывания с данной РНК близки к таковым для ДНК ($K_b = 0.86 \cdot 10^5$ л · моль⁻¹ и $n = 25$ в 5 ммоль · л⁻¹ фосфатном буфере (pH 7.0)).

Большинство данных, приведенных в табл. 1, получено с помощью техники тушения флюоресценции битиазольных колец. Этот метод наряду с достоинствами (простота применения и быстрота получения данных), обеспечившими его широкое использование, имеет ряд ограничений. Во-первых, квантовый выход такой флюоресценции невелик и составляет приблизительно 0.01 (см.³⁸). Хелатирование иона металла дополнительно уменьшает флюоресценцию блеомицина,^{54, 57} что накладывает ограничения на точность получаемых этим методом данных. Во-вторых, недавно было показано,⁵⁵ что при возбуждении блеомицина светом с длиной волны 300 нм интенсивность флюоресценции заметно падает во времени вследствие разрушения или фототрансформации остатка битиазола, что не учитывалось в ранних работах. И наконец, флюоресценцию блеомицина эффективно гасит не только двухцепочечная ДНК (данные по связыванию с которой приведены в табл. 1), но также и одноцепочечная ДНК, и РНК.^{54, 57} В то же время известно, что ни одноцепочечная ДНК, ни РНК не защищают двухцепочечную ДНК от действия блеомицина.^{62–65} По-видимому, тушение флюоресценции блеомицина этими субстратами обусловлено разными типами связывания с разной аффинностью. Факт, что на двухцепочечной ДНК *E.coli* остается в 30 раз

больше меченного тритием блеомицина, чем на рибосомальной РНК после инкубации в одинаковых условиях и последующего диализа,³⁴ также говорит в пользу того, что тушение флюоресценции не является свидетельством прочного связывания. Кроме того, само тушение флюоресценции зависит от состава ДНК, при этом poly(dG)- и poly(dG) · poly(dC)-последовательности гасят флюоресценцию в большей степени.^{54, 57} По-видимому, приведенные в табл. 1 данные по K_b и n являются средними значениями для разных мест связывания с разной аффинностью.

Другой вариант использования техники тушения флюоресценции для определения параметров связывания блеомицина с ДНК описан в работе⁵⁸. Для возбуждения флюоресценции авторы использовали свет с длиной волны 260, а не 300 нм как обычно. Это позволило увеличить разницу между флюоресценцией связанного с ДНК и свободного блеомицина и тем самым повысить чувствительность метода. В результате были получены две константы связывания блеомицина с ДНК poly(dA) · poly(dT). Одна из них с одной связанной молекулой на 10 пар оснований, отвечающая более прочному связыванию, составляет $(7–9) \cdot 10^6$ л · моль⁻¹, а вторая с одной связанной молекулой на 1.5 пары оснований равна $5 \cdot 10^4$ л · моль⁻¹. Существование разных мест связывания было также показано методом равновесного диализа для меченного тритием блеомицина А₂ и его медного комплекса.⁴⁹ Разница между K_b^1 и K_b^2 , определенная для ДНК из тимуса телят, оказалась незначительной ($6.8 \cdot 10^5$ и $2.5 \cdot 10^5$ л · моль⁻¹). Большее различие между константами связывания наблюдалось для связывания блеомицина А₂ с гомополинуклеотидами poly(dG) · poly(dC) и poly(dA) · poly(dT) (табл. 1).

Таким образом, параметры равновесного связывания, полученные различными методами, свидетельствуют о значительном родстве блеомицина и его металлокомплексов к двухцепочечной ДНК. Прочное связывание антибиотика с

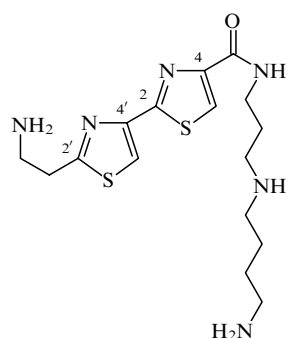
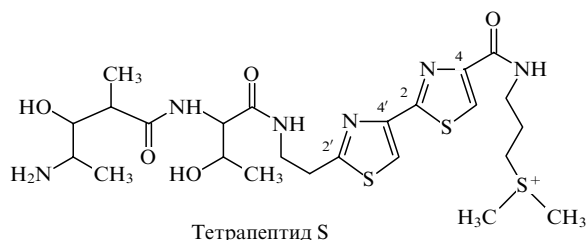
двойной спиралью предшествует серии событий, приводящих к окислительной деструкции цепи ДНК.^{41, 66}

2. Участие доменов в связывании

а. Роль битиазольного остатка и С-концевого амина в связывании с ДНК

Спектроскопия ЯМР явилась исторически первым и наиболее информативным методом, позволившим зарегистрировать участие определенных частей молекулы блеомицина в связывании с ДНК. При взаимодействии антибиотика с ДНК из тимуса телят в спектре ПМР в первую очередь уширились и изменялись по интенсивности сигналы протонов битиазольного остатка и диметилсульфониевой группы, что свидетельствовало о наиболее прочном связывании этих частей молекулы блеомицина А₂ с ДНК.³⁸ Явление тушения флюоресценции битиазольных колец, обнаруженное этими же авторами, также говорило в пользу взаимодействия битиазольного остатка с ДНК. Вслед за этой работой последовала целая серия исследований методом спектроскопии ЯМР взаимодействия блеомицина А₂ и его производных с poly(dA) · poly(dT).^{40, 58, 60, 67–71} Было установлено, что значительные спектральные изменения наблюдались только при связывании блеомицина с двухцепочечной формой ДНК. В этом случае максимальные спектральные изменения также происходили с сигналами ароматических протонов битиазольного остатка, которые при взаимодействии с poly(dA) · poly(dT) уширились и сдвигались в более сильное поле. Сдвиг в более сильное поле был зарегистрирован также для соседних протонов: $\text{CH}_3\text{—S}^+$, $\text{CH}_2\text{—S}^+$ концевого амина, $\text{CH}_2\text{—N}$ 2'-заместителя битиазольного остатка и $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ метилпентановой кислоты.⁶⁷ Аналогичные результаты были получены при изучении связывания блеомицина и его металлокомплексов с короткими дуплексными фрагментами ДНК.^{52, 72–75}

Использование ядерного эффекта Оверхаузера позволило зарегистрировать образование комплекса между блеомицином, содержащем ион Zn(II) или Fe(II) в металлсвязывающем центре, и ДНК.⁶⁸ Блеомицин в данном случае выступает в качестве связывающего звена между ДНК и ионом металла. Общее изменение химических сдвигов протонов блеомицина при формировании такого комплекса практически являлось суммой изменений, произошедших вследствие хелатирования иона металла и связывания с ДНК.⁴⁰



При этом сигналы протонов N-концевой части молекулы, включая β-оксигистидин и дисахарид, изменялись только при взаимодействии с металлом, С-концевого дипептида — только при взаимодействии с ДНК, а сигналы протонов 4-амино-3-окси-2-метилпентановой кислоты и треонина были чувствительны к обоим взаимодействиям.

Той же группой авторов исследовалось связывание с ДНК С-концевых фрагментов молекулы блеомицина А₂ (ацетилдипептида, трипептида S, тетрапептида S) и Blm-A₅. Характер изменения сигналов протонов битиазольного остатка и концевого амина был одинаковым для полной молекулы блеомицина и для ее С-концевых фрагментов.^{58, 60, 67, 69} Таким образом, данные спектроскопии ЯМР свидетельствуют о том, что С-концевой фрагмент молекулы блеомицина, содержащий 2'-(2-аминоэтил)-2,4'-битиазол-4-карбоновую кислоту, и концевой амин наиболее тесно взаимодействуют с ДНК и, по-видимому, определяют прочность связывания.

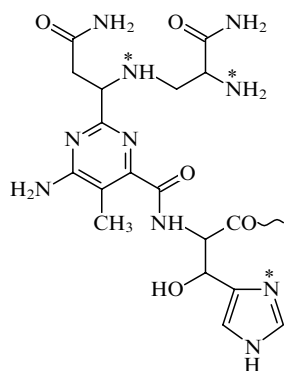
Этот вывод подтверждается данными равновесных методов. Параметры связывания с ДНК трипептида S и ацетилдипептида практически совпадают с таковыми для блеомицина А₂ (табл.1).^{38, 47, 55, 58, 60} В работе⁵⁵ проведено сопоставление констант связывания С-концевых фрагментов блеомицина А₂ по мере увеличения их длины, начиная с дипептидного фрагмента. Дипептидный фрагмент дает основной вклад в связывание, добавление L-треонина увеличивает константу связывания в 2 раза, а добавление 4-амино-3-окси-2-метилпентановой кислоты и β-оксигистидина уже не изменяет константу связывания.

Это согласуется с данными о способности С-концевых фрагментов блеомицина ингибировать расщепление ДНК полным антибиотиком.^{76, 77} При этом в отличие от других ингибиторов С-концевые фрагменты уменьшают расщепление пропорционально по каждому положению, не меняя специфичности расщепления, т.е. ингибирование осуществляется конкурентно.⁷⁶ К этому необходимо добавить, что аналоги блеомицина, не содержащие битиазольного остатка и С-концевого амина, расщепляют ДНК гораздо менее эффективно, чем сам блеомицин.^{78–81} В то же время они способны хелатировать ион железа и эффективно окислять некоторые органические субстраты, например *цис*-олефины.⁷⁸

б. Влияние электростатических взаимодействий на связывание блеомицина с ДНК

Данные табл. 1 свидетельствуют о зависимости параметров связывания блеомицина с ДНК от ионной силы среды, что указывает на существование электростатических взаимодействий между блеомицином и ДНК. Повышение ионной силы среды приводит также к падению предельной степени тушения флюоресценции.⁵⁴ Аналогично, повышение ионной силы с 10 до 150 ммоль · л⁻¹ существенно уменьшает изменение химического сдвига ароматических протонов битиазольного остатка (H(5) и H(5')) и метильных $\text{CH}_3\text{—S}^+$ протонов блеомицина А₂, взаимодействующего с poly(dA) · poly(dT). При этом полностью подавляется изменение химических сдвигов протонов $\text{CH}_2\text{—N}$ заместителя, находящегося в положении 2', битиазола и $\text{CH}_2\text{—S}^+$ С-концевого амина. При ионной силе 1 моль · л⁻¹ никаких изменений в спектре ПМР блеомицина, добавленного к ДНК, не наблюдается.⁷¹

Необходимо отметить, что сама молекула блеомицина (без концевого амина) несет несколько ионогенных групп, находящихся на N-концевом участке молекулы: вторичную NH-группу β-аминоаланина, входящего в состав пиримидо-бламиновой кислоты ($\text{pK}_a = 2.7\text{--}2.9$), атом N(1) имидазольного кольца β-оксигистидина ($\text{pK}_a = 4.7\text{--}4.9$), первичную NH₂-группу β-аминоаланина ($\text{pK}_a = 7.3\text{--}7.7$).^{27, 82, 83} Ниже приведена структура N-концевого фрагмента Blm, звездочками отмечены ионогенные группы в пределах pH 2–8.



Это означает, что положительный заряд у молекулы блеомицина при pH 7.5 и выше в основном сосредоточен на С-концевом амине, который и обеспечивает электростатические взаимодействия с отрицательно заряженным остовом ДНК. Существует ряд фактов, подтверждающих это.

1. Блеомициновая кислота, несущая отрицательный заряд на С-конце, очень слабо расщепляет ДНК.^{57, 63, 84}

2. Степень тушения флюоресценции при связывании с ДНК возрастает в ряду: блеомициновая кислота (отрицательно заряженный С-конец) < блеомицин В₁ (нейтральный С-конец) < блеомицин А₂ (положительно заряженный С-конец).^{54, 57}

3. Деметилблеомицин А₂ и дегликоблеомицин А₁ с нейтральными С-концевыми фрагментами гораздо слабее расщепляют ДНК, чем блеомицин А₂ (см.^{69, 70, 81, 84}). При взаимодействии ДНК и деметилблеомицина А₂ у последнего не наблюдается изменений в спектре ПМР.^{69, 70}

4. Медный комплекс деметилблеомицина А₂ в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л⁻¹ практически не раскручивает суперскрученную плазмидную ДНК, в то время как медный комплекс блеомицина А₂ эффективно ее раскручивает.⁸⁵

В то же время есть свидетельства влияния положительного заряда на N-конце молекулы блеомицина на связывание его с ДНК. Ацетилирование первичной аминогруппы β-аминоаланина ведет к образованию ацетилблеомицина А₂, N-конец которого нейтрален при pH 6.8. У такого производного при взаимодействии с poly(dA)·poly(dT) практически не происходит изменений в спектре ПМР.⁶⁹ Появление положительного заряда на N-конце молекулы блеомицина А₂ при pH < 7 (6.8 и 4.5) ведет к увеличению сдвига сигналов протонов битиазола в сильное поле. Однако при этом не наблюдается каких-либо изменений в сдвигах сигналов протонов N-концевой части молекулы вследствие взаимодействия с ДНК.⁷¹ Хелатирование иона металла, например Cu(II) или Fe(III), также ведущее к появлению положительного заряда на N-концевой части молекулы,^{83, 83} слабо отражается на константе связывания.^{49, 56, 57} Появление же дополнительного заряда на С-конце молекулы антибиотика (блеомицин А₅) увеличивает степень тушения флюоресценции и сродство к ДНК.^{54, 57}

Перечисленные выше факты свидетельствуют в пользу того, что электростатические взаимодействия необходимы для связывания блеомицина с ДНК. При этом положительный заряд на С-концевом амине играет определяющую роль в обеспечении прочного связывания с ДНК.

в. Взаимодействие N-концевого участка молекулы блеомицина с ДНК

В конце 70-х годов о структуре молекулы блеомицина и связи ее с биологическим действием антибиотика сложилось вполне определенное представление: С-концевой фрагмент молекулы связывается с ДНК, а N-конец хелатирует ион металла (железа), который реагирует с молекулярным кислородом, что приводит к деструкции ДНК.³⁸⁻⁴⁰ При этом

взаимодействие металлсвязывающего центра с ДНК считалось очень слабым. Тем не менее в спектре ПМР N-концевой части молекулы блеомицина и его комплекса с ионом цинка наблюдаются незначительные, но надежно регистрируемые изменения при взаимодействии с poly(dA)·poly(dT).⁴⁰ Еще более заметные изменения происходят при взаимодействии комплекса CO—Fe(II)Blm-A₂ с ДНК. Кроме уширения и сдвига в более сильное поле сигналов протонов битиазольного остатка и концевой амина заметно уширяются и слегка смещаются сигналы ароматических протонов β-оксигистидина. Происходит также сдвиг в сильное поле (на 0.08 м.д.) сигналов метильных протонов пиримидина.⁸⁶ Это указывает на наличие контакта между N-концевой частью молекулы блеомицина и остовом ДНК.

Данные ПМР по связыванию блеомицина с короткими олигонуклеотидными дуплексами также свидетельствуют о взаимодействии металлсвязывающего домена с двойной спиралью.^{52, 73-75} Наиболее интересной в этом отношении является работа по изучению связывания блеомицина А₅ с восьмизвенным дуплексом d(CGCTAGGCG)₂ (см.⁷⁵). Используя ядерный эффект Оверхаузера, авторы этой работы зарегистрировали существование межмолекулярных взаимодействий между протонами α-CH₂ группы β-оксигистидина и H(4') остатка дезоксирибозы C(7). Также предполагается образование водородной связи между NH₂-группой β-аминоаланина и кислородом рибозо-фосфатного остова цепи олигонуклеотида.

Данные ЭПР также свидетельствуют о взаимодействии металлсвязывающего домена с ДНК. Так, при взаимодействии комплекса NO—Fe(II)Blm с ДНК тимуса телят наблюдались заметные спектральные сдвиги, что говорит об изменении окружения иона железа.^{45, 87, 88} О непосредственном взаимодействии металлсвязывающего центра с ДНК свидетельствует изменение спектра ЭПР «активированного блеомицина» (НОО—Fe(III)Blm) при связывании с двойной спиралью.⁸⁹ Связывание с ДНК переводит комплекс Fe(III)Blm из высокоспинового состояния ($g = 4.3$) в низкоспиновое ($g = 2.45, 2.18, 1.89$). При этом нативная двухцепочечная ДНК стабилизирует низкоспиновое состояние эффективнее, чем денатурированная.⁸⁹

Характерные изменения в спектре ЭПР вызывало добавление ДНК к комплексу O₂—Co(II)Blm-A₂, имитирующему активный комплекс O₂—Fe(II)Blm-A₂.^{90, 91} Это, очевидно, связано со сменой ориентации молекулы кислорода относительно плоскости, содержащей ион кобальта. Недавние исследования⁹² такого же комплекса показали существенные ограничения в ориентации связи O—O, которая располагается практически перпендикулярно главной оси спирали ДНК.

Убедительным доказательством близкого контакта металлсвязывающего домена и ДНК является вытеснение лиганда L из координационной сферы комплекса L—Fe(III)Blm, где L — лиганд типа N₃⁻, S₂O₃²⁻ или SCN⁻, при взаимодействии с ДНК.⁵¹

Упомянувшееся выше влияние положительного заряда на N-конце молекулы на связывание блеомицина с ДНК также можно отнести к фактам, свидетельствующим о взаимодействии металлсвязывающего домена с ДНК. При этом необходимо выделить работу⁸⁵, в которой показано, что хелатирование иона Cu(II) блеомицином А₂ приводит к качественному изменению связывания антибиотика с суперскрученной плазмидной ДНК. Если не содержащий металла блеомицин А₂ практически не способен раскручивать такую ДНК в условиях, исключающих расщепление, то медьсодержащий антибиотик эффективно удаляет витки суперспирали. В дополнение к этому следует отметить, что комплексы Cu(II) и Fe(III) блеомицина связываются с ДНК с разными скоростями, что также отражает участие N-конца молекулы во взаимодействии с полимером.⁴⁸

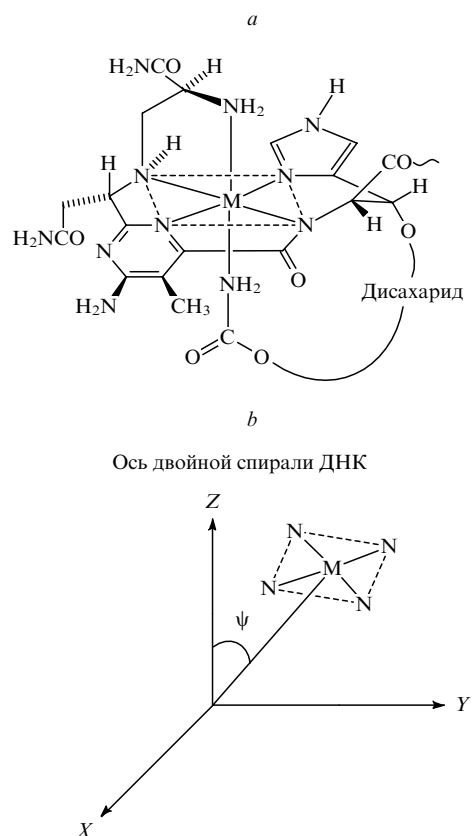


Рис. 1. Структура участка молекулы блеомицина, хелатирующего ион меди (а)^{93, 94} и возможное расположение плоскости, содержащей ион металла относительно оси спирали ДНК (б)^{96, 97}

Использование метода ЭПР в случае ориентированных волокон ДНК позволяет получить ценную информацию о расположении металлсвязывающего домена относительно оси двойной спирали ДНК. Как известно, хелатирующие ионы меди или железа атомы азота N-концевой части молекулы — атом азота вторичной аминогруппы β-аминоаланина, атом N(1) пиримидина, атом N(1) имидазола и атом азота β-оксигистидина, образующий пептидную связь,^{39, 93, 94} — лежат в одной плоскости вместе с ионом металла (рис. 1). Для связанной с ДНК молекулы блеомицина угол ψ между нормалью (перпендикуляром) к данной плоскости и осью спирали ДНК составляет по ранним данным для комплекса Cu(II)Blm 15° со свободой вращения нормали вокруг одной из осей, лежащих в плоскости пар оснований $\pm 80^\circ$ (см.⁹⁵). Поставленные недавно эксперименты на такой же модели дали несколько другие результаты: угол между нормалью и осью спирали ДНК составил 25° с колебаниями в пределах $\pm 30^\circ$ (см.⁹⁶). Это практически совпадает с полученными ранее цифрами для связанного с ориентированными волокнами ДНК комплекса Fe(III)Blm (величина угла для такой модели составляет $15\text{--}30^\circ$ с возможностью изменяться на $\pm 26^\circ$).⁹⁷

Таким образом, существуют многочисленные данные, свидетельствующие о тесном контакте N-концевой части молекулы блеомицина с ДНК. Этот контакт проявляется также во влиянии металлсвязывающего домена на специфичность расщепления ДНК, о чем будет сказано ниже.

3. Модели связывания блеомицина с ДНК

Данные различных физико-химических методов свидетельствуют о том, что во взаимодействие с ДНК вступают как металлсвязывающий центр, так и С-концевая часть моле-

кулы блеомицина. При этом наиболее прочно ассоциирован с ДНК С-концевой фрагмент (битазольный остаток и концевой амин) молекулы антибиотика, который и определяет связывание с полимером. Выше уже говорилось о вкладе электростатических взаимодействий между положительно заряженным концевым амином и отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом в связывание с ДНК. Существуют, однако, и иные взаимодействия, определяющие связывание битазольных колец с ДНК. Есть три гипотезы о природе такого связывания: интеркаляционная модель связывания; модель частичной интеркаляции; связывание в малой бороздке ДНК.

Оба гетероциклических кольца битазольного фрагмента молекулы блеомицина лежат в одной плоскости⁹⁸ и теоретически способны интеркалировать между парами оснований ДНК. Впервые экспериментальные доказательства интеркаляционного связывания блеомицина были получены в 1979 г.⁴⁷ Было показано, что блеомицин A₂ и его С-концевой фрагмент — трипептид S — во-первых, раскручивают двухцепочечную кольцевую ковалентно замкнутую ДНК, во-вторых, увеличивают длину коротких палочкообразных молекул ДНК, определенную по временам их ориентации в электрическом поле, и, в-третьих, способствуют параллельному расположению битазольных колец (по данным линейного дихроизма) парам оснований.⁴⁷ Все эти изменения обычно происходят в случае интеркаляционного типа связывания.⁹⁹ Металлокомплексы блеомицина проявляют такие же свойства при связывании с ДНК.

Выше уже упоминалось о способности медьсодержащего комплекса блеомицина A₂ релаксировать суперскрученную ДНК.⁸⁵ По данным авторов работы⁴⁸ длина коротких ДНК (150 пар оснований) при связывании с молекулой Cu(II)Blm увеличивается на 0.46 нм. Для комплекса Fe(III)Blm эта величина равна 0.32 нм, а для Blm — 0.31 нм (см.⁴⁷). Такое удлинение характерно для типичных интеркаляторов.^{99, 100} В то же время медьсодержащий комплекс блеомицина, аналога блеомицина с одной восстановленной связью в тиазольном кольце,¹⁰¹ совсем не удлиняет ДНК при связывании.⁴⁸ Это указывает на необходимость плоского хромофора для удлинения ДНК.

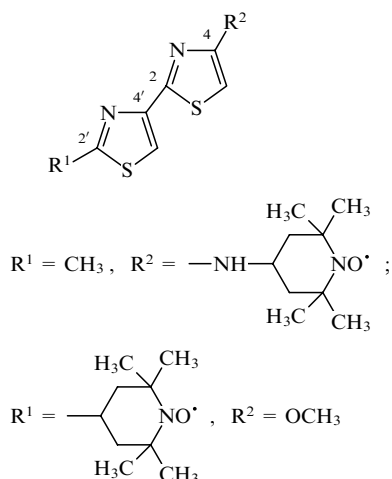
В 1981 г. авторы работы¹⁰² на основании данных ЯМР предложили модель полного интеркаляционного связывания С-концевого фрагмента блеомицина с динуклеотидами. Наибольшее изменение химического сдвига (0.4 м.д.) наблюдалось для ароматических протонов битазола при связывании с динуклеотидом pdG-dC. В соответствии с этой моделью остаток битазола находится в «стэкинге» с парами оснований, располагаясь между ними так, что его ароматические протоны направлены в сторону малой бороздки. Теоретические расчеты подтвердили наибольшую энергетическую выгодность предложенной интеркаляционной модели при связывании концевого положительно заряженного амина в малой бороздке.¹⁰³

В опубликованной недавно работе⁷⁴ методом двумерного ЯМР было исследовано связывание кобальтсодержащего комплекса блеомицина A₂ с 10-звенным ДНК-дуплексом d(CCAGGCCTGG)₂ и показано, что остаток битазола интеркалирует между парами GC, соответствующими положениям C(6) и C(7). При этом сдвиг сигналов протонов битазола в сильное поле составил для H(5) — 0.9, а для H(5') — 0.61 м.д.

Однако модель полного интеркаляционного связывания не согласуется с многочисленными экспериментальными данными. Так, угол раскручивания суперспирализованной ДНК при связывании молекулы блеомицина оказался равен 12° (см.⁴⁷), в то время как для большинства интеркаляторов он составляет $17\text{--}26^\circ$ (см.¹⁰⁰). Взаимодействие блеомицина с ДНК, обработанной ультразвуком, практически не вызвало увеличения вязкости раствора и, следовательно, длины ДНК,³⁸ что противоречит результатам работы⁴⁷. Более того,

вискозиметрические данные, полученные для связывания С-концевого фрагмента блеомицина с ДНК тимуса теленка, свидетельствуют о незначительном уменьшении длины молекул ДНК.¹⁰⁴ Данные, полученные методом лазерного сканирования, свидетельствуют об уменьшении длины коротких палочкообразных ДНК при связывании с ними антибиотика.¹⁰⁵

Введение спиновых меток в молекулы является удобным методом для определения характеристик их связывания с ДНК.^{106, 107} Спектр ЭПР такой метки (2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидин-*N*-оксида), введенной в положение 4 или 2' остатка битиазола, практически не менялся при взаимодействии последнего с ДНК, что маловероятно при полном интеркационном связывании.¹⁰⁴



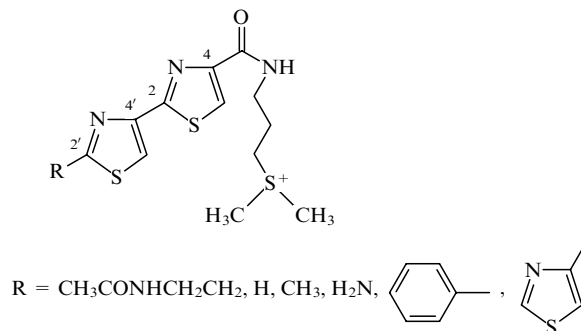
Изменения в спектре ПМР блеомицина при связывании его с poly(dA)·poly(dT) также не согласуются с моделью полной интеркаляции. Несмотря на то что наибольшие изменения происходят с сигналами протонов битиазольных колец: максимальная величина их сдвига в сильное поле составляет 0.1–0.2 м.д.,^{38, 40, 67, 69–71} в то время как для типичных интеркаляторов она равна 0.4–1.0 м.д.^{108, 109} Отметим также, что величина химического сдвига сильно зависит от температуры, колеблясь от 0.02–0.05 м.д. при 20°C до 0.1–0.2 м.д. при температурах, непосредственно предшествующих плавлению poly(dA)·poly(dT) (50–60°C),^{67, 69, 71} что не объясняется в рамках модели полной интеркаляции.

К настоящему моменту появился целый ряд работ, посвященных изучению взаимодействия блеомицина и его металлокомплексов с олигонуклеотидными дуплексами методом ЯМР.^{52, 72–75} Большинство из полученных в них данных также свидетельствует против модели полной интеркаляции. Так, в работе⁵² исследовали взаимодействие блеомицина с дуплексом d(CCCCAGCTGGGG)₂, обладающим единственным сайтом расщепления для антибиотиков (подчеркнут). Сигналы необменивающихся протонов битиазольного остатка и концевых амина блеомицина имели характерный сдвиг в сильное поле (0.15–0.2 м.д.). Однако никаких изменений химических сдвигов сигналов иминопротонов и фосфорных ядер олигонуклеотида вокруг места связывания не наблюдалось. В то же время известно, что интеркалирующие молекулы вызывают заметные изменения химических сдвигов сигналов этих ядер.^{110, 111} Несколько больший сдвиг сигналов протонов битиазола в сильное поле (0.2–0.4 м.д.) наблюдается при взаимодействии антибиотика с дуплексом d(CGCGCG)₂ (см.^{72, 73}). В этом случае не наблюдается характерной для poly(dA)·poly(dT) зависимости величины химических сдвигов от температуры, что, возможно, обусловлено более прочным типом связывания блеомицина с GC-последовательностями. Использование

ядерного эффекта Оверхаузера позволяет отличить интеркаляционный тип связывания.¹¹² Наличие кросс-пиков вдоль всей цепи восьмизвенного дуплекса d(CGCTAGCG)₂ при взаимодействии с ним блеомицина А₅ свидетельствует о неинтеркаляционном типе связывания последнего.⁷⁵

Чтобы объяснить экспериментальные данные, свидетельствующие об интеркаляции и против нее, была привлечена гипотеза о частичной интеркаляции битиазольных колец, предложенная теоретически еще в 1976 г.¹¹³ Согласно данному представлению одно из колец битиазола встраивается между основаниями ДНК, вызывая локальный изгиб спирали. Влияние такого изгиба на длину и, следовательно, гидродинамические свойства ДНК может быть очень разным,¹¹⁴ что подтверждается вискозиметрическими данными^{38, 104} и данными лазерного сканирования.¹⁰⁵ Такая модель объясняет и относительно небольшое изменение химического сдвига сигналов битиазольных протонов и зависимость величины химического сдвига от температуры. Повышение температуры до значений, непосредственно предшествующих плавлению цепей, вызывает локальную денатурацию спирали, что облегчает внедрение остатка битиазола между парами оснований, увеличивая сдвиг протонных сигналов в сильное поле.⁷¹ Уменьшение ионной силы, ведущее к дестабилизации двойной спирали, также должно способствовать частичной интеркаляции битиазола и, как следствие, увеличивать тушение флуоресценции и изменение химического сдвига.^{54, 71}

На малую вероятность полной интеркаляции битиазольных колец в двойную спираль ДНК указывают данные экспериментов с аналогами С-концевого фрагмента молекулы блеомицина А₂.



Удаление алифатического заместителя в положении 2' у производного 2,4'-битиазола по данным ПМР повышает способность битиазольных колец к интеркаляции и увеличивает их константу связывания с poly(dA)·poly(dT).^{58, 69} А замещение алифатической цепи в положении 2' на ароматическое кольцо (тиазольное или бензольное) сильно изменяет характеристики связывания аналогов битиазола с ДНК, обеспечивая их интеркаляцию. Для таких аналогов при связывании с ДНК наблюдается гораздо большее по сравнению с блеомицином изменение химического сдвига (на 0.5–0.8 м.д.).^{58, 69, 115, 116} В отличие от блеомицина они вызывают увеличение вязкости растворов ДНК¹¹⁶ и эффективное раскручивание и закручивание (положительная суперспирализация) кольцевой ковалентно замкнутой ДНК.⁷⁷ Кроме того они обладают большим родством к ДНК и являются более мощными конкурентными ингибиторами расщепления.⁷⁷ Таким образом, остаток битиазола, хотя и не способен к полному интеркаляционному связыванию с ДНК, но склонен частично внедряться между парами оснований. Особенно благоприятными участками для такого связывания являются места локального нарушения двухспиральной структуры (переходные участки между денатурированным и нативным состоянием спирали, изгибы и изломы спирали, места «выпячивания» лишнего основания и т.д.).

Существует еще одна модель связывания блеомицина с ДНК, объясняющая имеющиеся экспериментальные данные. Эта модель предполагает связывание концевого амина и битиазольных колец блеомицина в малой бороздке ДНК. Она была предложена в 1986 г.¹¹⁷ и основана на сходстве структуры С-концевого участка блеомицина со связывающимися в малой бороздке ДНК нетропсином и флюоресцентным красителем Hoechst 33258. Предложенную модель подтверждают эксперименты по изменению сайт-специфичности и эффективности расщепления ДНК антибиотиком в присутствии прочносвязывающихся с ДНК лигандов. Дистамицин А, связывающийся в малой бороздке ДНК с участками, богатыми последовательностями АТ, ингибирует расщепление по последовательностям GT и GA, увеличивая селективность расщепления по последовательностям GC.^{118–120} В то же время актиномицин D, связывающийся с последовательностями GC и блокирующий малую бороздку пептидными кольцами вокруг места связывания на 5–6 пар оснований,¹²¹ дает обратный эффект: увеличивается расщепление по последовательностям GT и GA и уменьшается расщепление по последовательностям GC. Ковалентное присоединение афлатоксина В к атому N(7) гуанина или митомицина С к атому O(6) гуанина, осуществляющееся в большой бороздке ДНК, практически не влияет на специфичность и эффективность расщепления такой ДНК блеомицином.¹²² Аналогично присутствие объемных (гликозилоксидетильных остатков в большой бороздке ДНК фага Т4 дикого типа не оказывает существенного влияния на специфичность и эффективность расщепления.¹²³ В дополнение к этому, блеомицин имеет одинаковое сродство к гликозилированной и негликозилированной ДНК фага Т4.¹²⁴ На сродство к ДНК в большой степени влияет ее нуклеотидный состав, а именно, присутствие гуанина и последовательностей 5'-гуанин-пиримидин-3'. Так, последовательности ДНК, богатые G и GC, более эффективно тушат флюоресценцию битиазольных колец,^{54, 57} а поли- и олигонуклеотиды, содержащие последовательности GC и GT, являются наиболее эффективными ингибиторами расщепления ДНК SV-40 антибиотиком.^{63, 64} Константа связывания блеомицина с poly(dG)·poly(dC) больше констант связывания с poly(dI)·poly(dC) и poly(dA)·poly(dT) в 3 и 5 раз соответственно.¹²⁴ Следует отметить, что в малую бороздку двойной спирали poly(dG)·poly(dC) выходит 2-аминогруппа гуанина, которая отсутствует у инозина и аденина. Необходимость этой аминогруппы для прочного связывания блеомицина подтверждают эксперименты с ДНК, модифицированной антрамицином. Этот антибиотик, располагаясь в малой бороздке, образует ковалентную связь с 2-аминогруппой гуанина и не вызывает существенных изменений В-формы ДНК.¹²⁵ Обработка ДНК антрамицином ведет к сильному ингибированию расщепления блеомицином по последовательностям GC и GT.¹²⁴ На основании перечисленных фактов авторы последней статьи предложили модель связывания блеомицина с шестизвенным дуплексом d(ATGCCA)·d(TGGCAT), содержащим сайт эффективного расщепления (подчеркнут). Концевой амин и остаток битиазола располагаются вдоль малой бороздки ДНК в направлении от 5'- до 3'-конца относительно расщепляемой цепи. Связывание происходит за счет электростатических взаимодействий и образования водородных связей между 2-аминогруппой гуанина и азотом тиазольного кольца или/и кислородом карбоксамидной группы. Место связывания блеомицина охватывает 2–3 пары оснований, что соответствует данным по защите ДНК от расщепления ДНКазой I.¹²⁶

Результаты двумерного ЯМР также свидетельствуют о возможности связывания антибиотика в малой бороздке двойной спирали. Наиболее интересной в этом отношении представляется работа⁷⁵, данные которой во многом подтверждают высказанную ранее гипотезу.¹²⁶ Используя ядер-

ный эффект Оверхаузера, были зарегистрированы взаимодействия между протонами цинксодержащего комплекса блеомицина А₅ и протонами восьмизвенного дуплекса d(CGCTAGCG)₂, находящимися в малой бороздке двойной спирали. На основании полученных данных методами молекулярной динамики была рассчитана возможная пространственная структура комплекса. В соответствии с расчетами молекула блеомицина А₅ располагается в малой бороздке, перекрывая 4–5 пар оснований. Комплекс стабилизируется водородными связями между аминогруппами С-концевого остатка спермидина и кислородами фосфатной группы и дезоксирибозного цикла, между азотом тиазольного кольца и упомянутой выше 2-аминогруппой гуанина, а также между первичной аминогруппой β-аминоаланина и кислородом сахарофосфатного остова. Однако авторы утверждают, что приведенная ими структура не единственно возможная. Значительный сдвиг в сильное поле сигналов протонов битиазола (H(5) — на 0.18 и H(5') — на 0.52 м.д.) и имино-протонов GC- и AT-пар, соответствующих положениям G(2) и T(4), свидетельствует о возможной частичной интеркаляции битиазольных колец.⁷⁵

Итак, к настоящему моменту нет экспериментальных данных, позволяющих однозначно определить, какой тип связывания — полная или частичная интеркаляция или связывание в малой бороздке — характерен для блеомицина. Возможно, все эти типы связывания реализуются для разных структур двойной спирали ДНК. Тем не менее с уверенностью можно сказать, что С-концевой фрагмент молекулы блеомицина обеспечивает связывание антибиотика с ДНК, являясь «якорем» для остальной части молекулы, которая взаимодействует с полимером при окислительном расщеплении сахаро-фосфатного скелета. Вне зависимости от способа связывания С-концевого фрагмента молекулы механизм окисления ДНК (о котором будет сказано в следующей главе) предполагает непосредственную близость металлсвязывающего центра антибиотика и малой бороздки двойной спирали ДНК.

III. Расщепление нуклеиновых кислот блеомицином

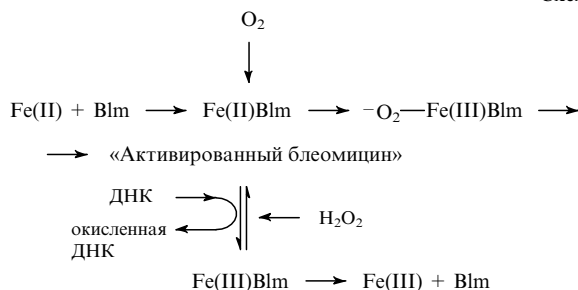
1. Механизм расщепления ДНК

Деструкция ДНК под действием блеомицина, ведущая к расщеплению сахаро-фосфатного скелета, была обнаружена еще в 1969 г.^{30–33} Однако механизм этого процесса долгое время оставался неясен. Первые теоретические предположения о возможном механизме расщепления ДНК были высказаны в 1973 г., при этом блеомицин рассматривался в качестве гидролитического фермента.^{113, 127} Вскоре обнаружилось существование кофакторов, необходимых для действия антибиотика. В 1975 г. было замечено, что деградации ДНК блеомицином способствует молекулярный кислород.¹²⁸ Тогда же нашли, что ионы Fe(II) и Fe(III) стимулируют расщепление ДНК блеомицином в присутствии 2-меркаптоэтанола.^{129, 130} Эти два кофактора, способствующие расщеплению ДНК, были выделены среди прочих, как необходимые.^{35–37} Наблюдавшаяся ранее деградация ДНК под действием блеомицина происходила благодаря постоянному присутствию следовых количеств ионов железа в реакционных смесях, о чем свидетельствуют данные атомной абсорбции.¹³⁰ Сразу же вслед за установлением необходимости присутствия ионов железа и молекулярного кислорода возникла гипотеза о свободнорадикальном механизме деградации ДНК.^{37, 56, 130–132} Действительно, комплекс Fe(II)Blm способен генерировать радикалы ·ОН,^{133, 134} которые могут реагировать с ДНК. Фермент супероксид дисмутаза, превращающий ион O₂²⁻ в O₂ и H₂O₂, ингибирует расщепление ДНК блеомицином.^{37, 135, 136} В работе¹³² показано, что существует

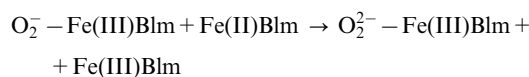
корреляция между биологической активностью аналогов блеомицина и количеством генерируемых ими радикалов $\cdot\text{OH}$.¹³² Однако вскоре выяснилось, что *трет*-бутилфенилнитрон и диметилсульфоксид, которые являются «ловушками» для радикалов $\cdot\text{OH}$, не ингибируют расщепление ДНК. Кроме того, эффективность продуцирования радикалов $\cdot\text{OH}$ комплексом Fe(II)Blm в 40 раз меньше, чем в случае системы $\text{Fe(II)}-\text{H}_2\text{O}_2$ (см.¹³⁷). Другая группа исследователей показала,¹³⁶ что ингибирование расщепления ДНК супероксид дисмутазой не связано с уменьшением количества ионов $\text{O}_2^{\cdot-}$ а, что более вероятно, является следствием ассоциации фермента с ДНК.

Было предложено и другое объяснение механизма действия блеомицина, основанное на образовании так называемого «активированного блеомицина», который непосредственно вызывает окислительную деградацию ДНК.^{89, 138, 139} Данные электронной спектроскопии и ЭПР, использование эффекта Мессбауера позволили предложить схему расщепления ДНК блеомицином при участии иона железа и молекулярного кислорода (схема 1).⁸⁹

Схема 1



Образующийся на первой стадии комплекс Fe(II)Blm быстро взаимодействует с молекулярным кислородом. В таком комплексе двухвалентный ион железа окисляется с образованием $\text{--O}_2\text{--Fe(III)Blm}$. Для формирования «активированного блеомицина» необходим еще один дополнительный электрон, который поступает либо с присутствующего в растворе восстановителя, либо с другой молекулы Fe(II)Blm в процессе диспропорционирования.¹³⁹



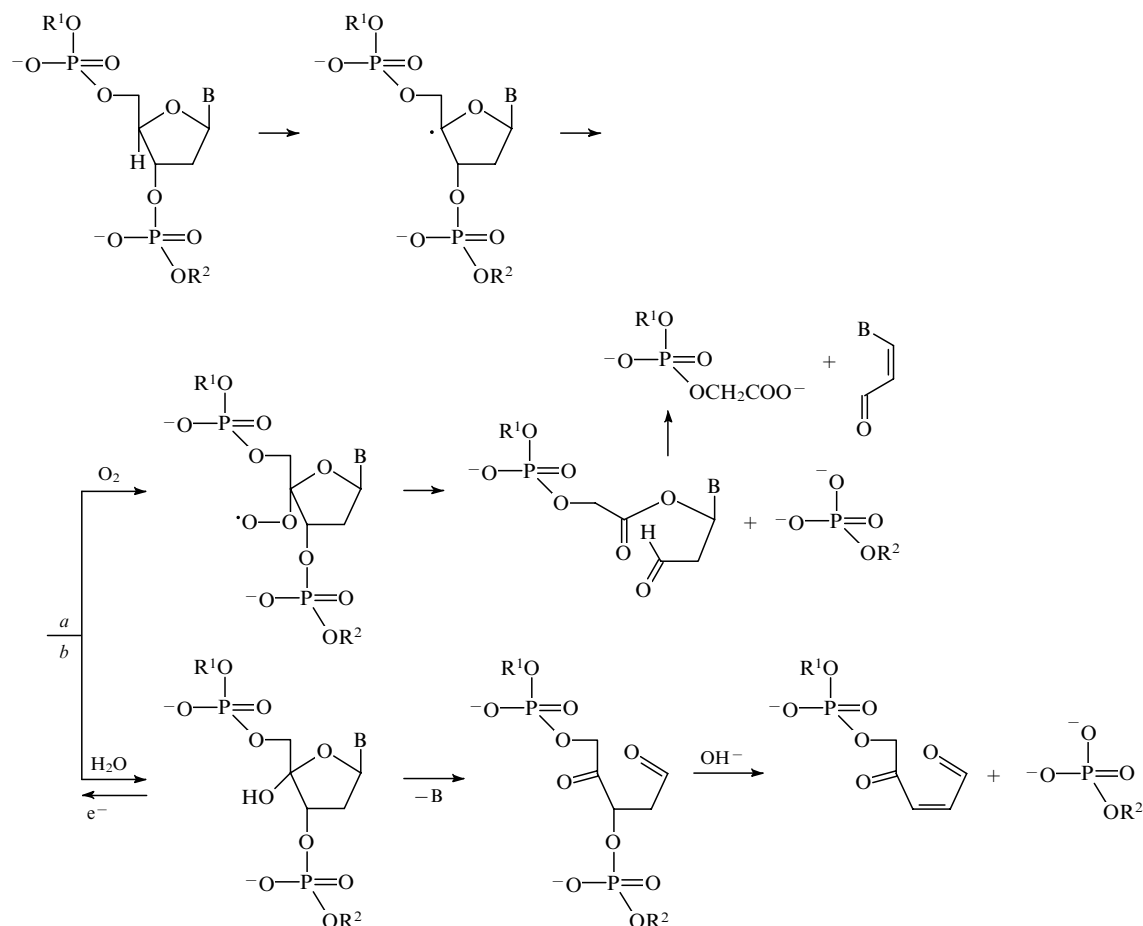
«Активированный блеомицин» способен окислять органические субстраты и ДНК с образованием Fe(III)Blm , который может реактивироваться пероксидными соединениями.^{89, 138–142}

Структура «активированного блеомицина» по последним данным, полученным с помощью масс-спектрометрии, соответствует пероксокомплексу трехвалентного железа HOO--Fe(III)Blm (см.¹⁴³). Эта схема описания активности блеомицина при участии ионов железа и молекулярного кислорода была подтверждена и в дальнейшем получила развитие.

Благодаря интенсивным исследованиям механизма действия антибиотика уже к концу 80-х годов были установлены все основные этапы активации блеомицина и пути окислительной деструкции ДНК, которые подробно изложены в обзорных статьях и сборниках.^{41, 66, 144, 145} В связи с этим в данном обзоре дано лишь краткое описание основных путей окисления ДНК блеомицином.

Активированный блеомицин вызывает окисление углеродного атома в положении 4' дезоксирибозного кольца.^{146–148} При этом происходит отрыв атома $\text{H}(4')$ с образованием 4'-радикала (схема 2). Эта стадия окисления

Схема 2



является лимитирующей в цепи последующих превращений, о чем однозначно свидетельствует изотопный эффект при замене атома водорода на дейтерий или тритий (в 2–7 и 7–12 раз соответственно падает скорость образования конечных продуктов).^{148–150}

Дальнейшие превращения 4'-радикала идут двумя разными путями (*a* и *b* на схеме 2).⁶⁶ В аэробных условиях (путь *a*) может осуществляться присоединение молекулярного кислорода с образованием 4'-пероксорадикала.¹⁴⁶ Последующий разрыв связи C(3')–C(4') приводит к выделению пропеналя основания и расщеплению сахара-фосфатного остова ДНК. В месте разрыва цепи образуются 5'-фосфат и 3'-фосфогликолят.^{146, 151, 152}

При реализации пути *b* происходит гидроксирование 4'-положения,¹⁴⁷ по-видимому, вследствие окисления 4'-радикала до карбокатиона и последующего присоединения воды.¹⁵³ В физиологических условиях гидроксирование приводит к выделению свободного основания без разрыва цепи ДНК.^{119, 147, 153–157} В щелочных условиях происходит β-элиминация, ведущая к разрыву сахара-фосфатного скелета. В месте разрыва образуется 5'-фосфат, а остаток окисленной дезоксирибозы превращается в 2,4-дигидроксициклопентенон, который остается ковалентно связанным с 3'-фосфатной группой. Если щелочную обработку приводить в присутствии гидразина, то образуется 3'-пиридазин, а обработка алкиламинами приводит к 3'-фосфату.¹⁵⁶

При нормальных условиях (атмосферное давление кислорода) окисление ДНК блеомицином ведет к выделению приблизительно одинаковых количеств свободных оснований и их пропеналей,¹⁵⁸ т.е. превращение 4'-радикала равновероятно по обоим путям. В анаэробных условиях образуется исключительно свободные основания.^{148, 158} При давлении кислорода 3 атм отношение образующихся пропеналей к свободным основаниям равно 7 (см.¹⁴⁸), а при 4 атм — 10 (см.¹⁵⁹).

Необходимо отметить высокую селективность действия блеомицина в отношении окисления дезоксирибозы. Выше уже отмечалось, что блеомицин очень вяло генерирует радикалы 'ОН.¹³⁷ Методом газовой хроматографии¹⁶⁰ в сочетании с масс-спектрометрическим анализом было показано, что практически не происходит образования побочных продуктов окисления ДНК (отличных от продуктов превращения 4'-радикала) при обработке последней комплексом Fe(II)Blm в присутствии молекулярного кислорода и восстановителя. В частности, образование главного побочного продукта 8-гидроксигуанина составляет лишь 2–3% от количества образующихся оснований и их пропеналей.^{160, 161}

2. Специфичность и эффективность расщепления ДНК блеомицином

а. Влияние первичной последовательности

Разработка удобного метода определения последовательности протяженных ДНК в 1977 г.¹⁶² послужила основой для целой серии работ, посвященных сиквенс-специфичности расщепления ДНК блеомицином и родственными ему соединениями. Оказалось, что блеомицин обладает выраженной специфичностью к динуклеотидным последовательностям, содержащим гуанин на 5'-конце.^{163, 164} При этом окислительному расщеплению подвергается дезоксирибоза второго нуклеотида. Наиболее предпочтительны для расщепления последовательности GT и GC. Более слабое расщепление наблюдается для последовательностей GA, AT и GG. Это соответствует количеству выделяемых свободных оснований: T > C ≫ A > G.^{37, 164, 165} Вскоре, однако, было замечено, что одинаковые динуклеотидные последовательности расщепляются в разной степени. Было высказано предположение, что специфичность расщепления блеомицином может

определяться последовательностями ДНК длиннее динуклеотидных.^{166, 167} Авторы работы¹⁶⁸ установили, что присутствие пиримидина на 5'-конце последовательности GC усиливает расщепление.¹⁶⁸ Статистический анализ сиквенс-специфичности блеомицинового расщепления подтвердил, что основание, предшествующее пурин-пиримидиновой последовательности, оказывает влияние на степень расщепления.¹⁶⁹ При этом тимин усиливает расщепление в последовательностях GT, GC, AT, AC, а аденин уменьшает.

б. Влияние структуры двойной спирали на расщепление блеомицином

Несмотря на выводы работы¹⁶⁸, которые впоследствии были подтверждены, нельзя полностью объяснить разницу в расщеплении ДНК, наблюдаемую для разных участков, только влиянием первичной последовательности. Авторы работы¹⁷⁰ определили, что блеомицин вызывает одно- и двухцепочечные разрывы ДНК бактериофага PM2 по ограниченному числу сайтов. При этом если ДНК находилась в суперскрученной форме, то некоторые из этих сайтов расщеплялись сильнее.^{171, 172} По данным работы¹⁷³ специфичность расщепления линейной ДНК pBR 322 отличалась от специфичности расщепления суперскрученной формы, причем степень расщепления последней была больше. Известно, что суперскрученная форма ДНК плазмиды *ColE1* расщепляется в 1.5 раза эффективнее, чем релаксированная.⁴⁷ Авторы работы¹⁷⁴ также обратили внимание на присутствие в ДНК SV40 участков со вторичной структурой, которые предпочтительно расщепляются блеомицином. Интересно, что внутриклеточная ДНК повреждается антибиотиком по тем же самым сайтам предпочтительного расщепления, что и очищенная ДНК.

Влияние структуры на эффективность расщепления проявляется при взаимодействии антибиотика с модифицированной ДНК. Так, ковалентное присоединение митомицина С (см.¹²²) или *цис*-диаминодихлороплатины(II)¹⁷⁵ в большой бороздке ДНК усиливает расщепление блеомицином. В случае *цис*-диаминодихлороплатины(II) меняется еще и специфичность расщепления,^{175, 176} что, вероятно, связано с изменением структуры двойной спирали ДНК вследствие внутрицепочечной сшивки. Интересные результаты, касающиеся усиления действия блеомицина, были опубликованы недавно.¹²⁰ Оказывается, дистамицин А существенно (в ~100 раз) увеличивает расщепление блеомицином в определенных богатых динуклеотидами GC последовательностях. При этом другие соединения, связывающиеся в малой бороздке, такие как Hoechst 33258, беренил, 4',6-диамидино-2-фенилиндол, вызывают лишь незначительное увеличение эффективности расщепления ДНК антибиотиком. Авторы предполагают, что такое значительное усиление расщепления ДНК обусловлено изменением структуры двойной спирали при связывании дистамицина А.¹²⁰

Наличие выступающего основания оказывает существенное влияние на специфичность расщепления блеомицином, направляя его действие на нуклеотиды, расположенные в непосредственной близости от данного основания.¹⁷⁷ Вполне вероятно, что такой характер действия обусловлен склонностью битиазольных колец к интеркаляции в участки с нарушенной вторичной структурой.⁷¹

Наглядное доказательство чувствительности антибиотика даже к незначительным изменениям структуры ДНК-мишени представили авторы работы¹⁷⁸, сравнив расщепление двух практически одинаковых последовательностей из человеческого генома. Замена 11 оснований в 340-звенном двухцепочечном фрагменте вызвала значительные изменения в характере расщепления. Статистический анализ показал, что часть таких изменений можно отнести за счет непосредственного влияния замещающего основания, а остальные изменения в расщеплении по участкам, расположен-

ным на расстоянии 2–12 нуклеотидов от места замены, являются следствием изменения структуры замещенной ДНК.

Влияние структуры двойной спирали на расщепление под действием антибиотика проявляется также при метилировании ДНК. Ферментативное метилирование остатков цитозина по положению 5 приводит к уменьшению степени расщепления вблизи таких сайтов. Защитный эффект сказывается даже на расстоянии 14 нуклеотидов от места метилирования для ДНК-дуплексов длиной 100–400 пар оснований.¹⁷⁹ По-видимому, это связано с локальными изменениями структуры ДНК, так как известно, что метилирование цитидина облегчает В–Z-переход, который является основным конформационным изменением для ДНК.¹⁸⁰ Дальнейшие исследования с $\text{poly(dG)} \cdot \text{poly(dC)}$ и $\text{poly(dG)} \cdot \text{poly(dC}^{\text{Me}})$ показали, что индуцирование В–Z-перехода повышением ионной силы раствора сильно ингибирует их расщепление блеомицином. Это указывает на то, что Z-форма ДНК конформационно неудобна для действия антибиотика. Дополнительным подтверждением служат данные кругового дихроизма. Так, в присутствии блеомицина для осуществления В–Z-перехода требуется большая ионная сила; это означает, что блеомицин предпочтительно связывает и стабилизирует В-форму ДНК.¹²³

Метилирование цитидина в разной степени ингибирует расщепление ДНК разными блеомицинами. Блеомицин деметил-А₂ и блеомицин В₂ менее чувствительны к присутствию 5-метилцитидина, чем блеомицин А₂ и блеомицин VAPP. В то же время метилирование аденозина по атому N(6) уменьшает расщепление ДНК всеми перечисленными блеомицинами.¹²³ В работе¹⁸¹ в качестве мишени использовали метилированный по одному из цитидинов самокомплементарный додекануклеотид; эффективность окисления блеомицином метилированного и неметилированного олигонуклеотидов была одинакова, но соотношение выделяемых свободных оснований и их пропеналей менялось. В случае метилированного додекануклеотида свободных оснований выделялось в 1.5 раза больше, чем в случае неметилированного, и, следовательно, 4'-радикал был более склонен гидроксилорваться, чем взаимодействовать с молекулярным кислородом.

Влияние вторичной структуры полинуклеотида на эффективность и специфичность расщепления антибиотиком особенно отчетливо проявляется при расщеплении РНК.

3. Расщепление РНК блеомицином

В ранних работах (приблизительно до середины 70-х годов) было неоднократно показано, что РНК устойчива к действию блеомицина.^{34, 182, 183} В гибридах РНК–ДНК расщеплялась только цепь ДНК.^{159, 184, 185} Расщепление ДНК блеомицином не ингибировалось даже большим избытком РНК.^{62–65, 186}

Это утвердившееся мнение было опровергнуто в 1989 г. Было показано, что приблизительно три молекулы Fe(II)BIm связываются с одной молекулой дрожжевой фенилаланиновой тРНК с равновесной константой связывания равной $0.86 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$. Расщепление осуществляется по трем дискретным сайтам с низкой эффективностью (5–10% при $0.3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \text{ Fe(II)BIm}$ и $3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ тРНК (в пересчете на нуклеотид)). При этом было зарегистрировано образование свободных аденина и урацила.⁶¹ После этой пионерской работы появился целый ряд работ^{65, 187–195}, касающихся взаимодействия блеомицина с РНК. В этих работах рассмотрены различные аспекты расщепления РНК в сопоставлении с расщеплением ДНК. Расщепление РНК, также как и ДНК, протекает благодаря окислению сахарофосфатного остова.¹⁹¹ В качестве необходимых кофакторов выступают ионы железа и молекулярный кислород (или пероксидные соединения).^{191, 194} Присутствие восстановителей, таких как аскорбат или 2-меркаптоэтанол, способствует

расщеплению РНК. Хроматографический анализ продуктов расщепления олигонуклеотидов и данные о подвижности в полиакриламидном геле продуктов расщепления протяженных РНК свидетельствуют о том, что в точке разрыва цепи образуются 3'-фосфогликолят и 5'-фосфат.^{191, 194} В отличие от ДНК при расщеплении РНК выделяются только свободные основания.^{61, 65, 191, 194} Вероятней всего, отщепление атома Н(4') рибозы является началом серии событий, ведущей к расщеплению цепи РНК.^{190, 192, 194}

Специфичность и эффективность расщепления РНК блеомицином заметно отличаются от таковых для ДНК. Во-первых, расщепление РНК осуществляется более селективно по меньшему числу сайтов. Во-вторых, эффективность расщепления антибиотиком сильно отличается для разных молекул РНК. Отдельные РНК заметно расщепляются при микромолярных концентрациях блеомицина, а некоторые РНК устойчивы к действию даже высоких ($0.3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$) концентраций антибиотика.^{61, 194}

Блеомицин расщепляет как одноцепочечные, так и двухцепочечные участки РНК. Однако наиболее эффективное расщепление происходит там, где одноцепочечная структура переходит в двухцепочечную и наоборот. Любопытно, что при этом не наблюдается характерная для ДНК сиквенс-специфичность. Из имеющихся данных следует, что молекула блеомицина предпочтительно расщепляет сайты GU.^{65, 188–190, 191, 193, 194} Однако далеко не все такие сайты расщепляются, и интенсивность расщепления для каждого GU-сайта может сильно отличаться. На основании изложенного выше можно сделать вывод, что специфичность расщепления РНК блеомицином зависит не столько от первичной последовательности, а определяется в большей мере особенностями вторичной или третичной структуры молекулы полимера. Устойчивость одних молекул РНК к действию блеомицина и лабильность других также говорит о необходимости наличия определенных пространственных структур для эффективного расщепления.

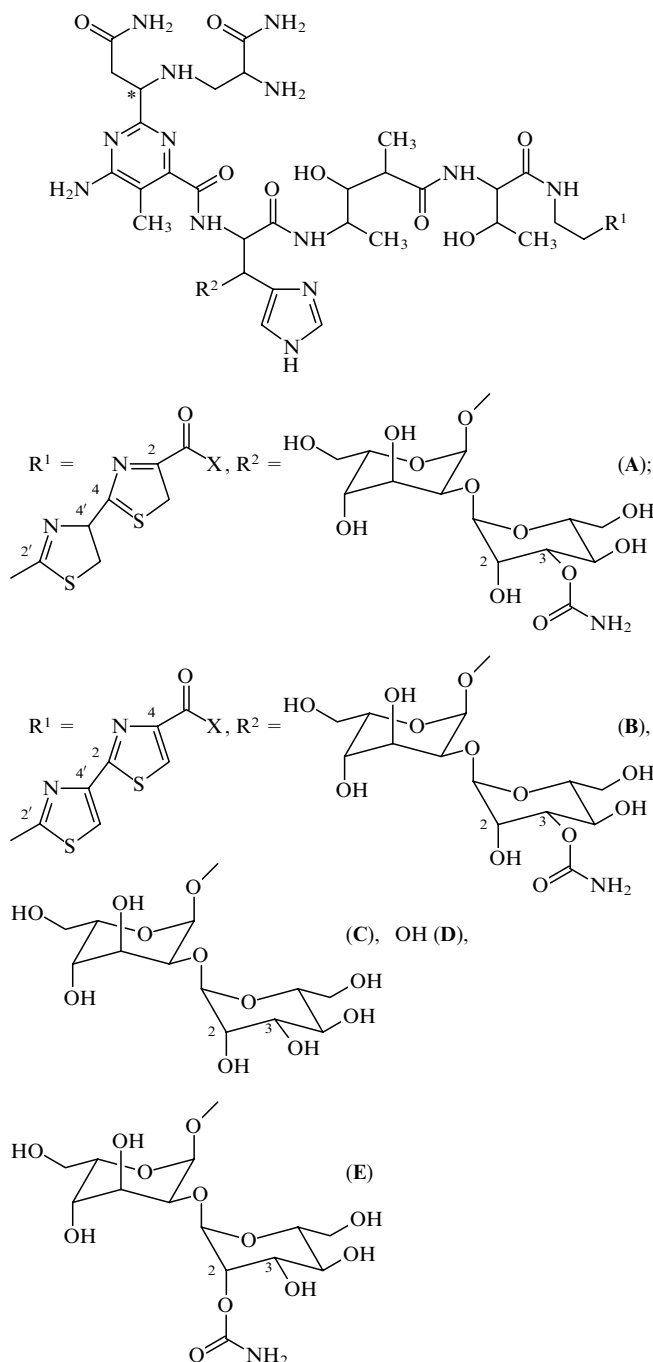
При взаимодействии блеомицина с РНК, по-видимому, проявляется его чувствительность к структуре расщепляемого субстрата. Как упоминалось ранее, блеомицин склонен расщеплять В-форму ДНК. Известно, что РНК образует двойную спираль А-формы. Разница в размерах малой и большой бороздки, в конформации углеводного остатка может быть причиной «неузнавания» и, как следствие, «нерасщепления» РНК. Тем не менее в определенных местах, например в местах перехода спирали из двухцепочечной формы в одноцепочечную и наоборот, могут образовываться структуры, удобные для расщепления блеомицином, может быть, напоминающие В-форму ДНК. При этом важную роль должен играть размер малой бороздки и расположение водородного атома 4' в ней. Можно предположить, что такие места способствуют более сильному связыванию антибиотика, например, из-за возможности интеркаляции битазольного остатка.^{71, 177} Малая встречаемость таких мест объясняет наличие немногих дискретных сайтов при расщеплении РНК, следствием чего является большая селективность расщепления РНК, чем ДНК.¹⁹⁴

Ярким подтверждением значимости пространственной структуры для эффективности расщепления двойной спирали являются данные работы¹⁹³, в которой было показано, что ДНК, являющаяся копией гистидиновой тРНК из *Bacillus subtilis*, имеет один основной сайт расщепления, совпадающий с единственным сайтом расщепления данной тРНК.

4. Участие доменов в определении специфичности действия блеомицина при расщеплении ДНК

При обнаружении сиквенс-специфического расщепления ДНК под действием блеомицина сразу возник вопрос о природе такой специфичности. К тому времени уже определили, что С-концевой фрагмент молекулы обеспечивает

связывание антибиотика с ДНК.^{38, 39, 47} Разные блеомицины демонстрировали идентичный характер расщепления ДНК,^{196, 197} свидетельствующий о том, что концевой амин не вносит какого-либо вклада в специфичность действия антибиотика. Поэтому предпочтительное расщепление определенных последовательностей ДНК объясняли специфичностью связывания битиазольного остатка, в частности, при интеркаляции.¹⁶⁴ Однако появляющиеся факты свидетельствуют против такой гипотезы.



Так, флеомицин (B), имеющий одну восстановленную связь в остатке битиазола¹⁰¹ и, следовательно, неспособный к интеркаляции, имеет такую же сайт-специфичность.^{48, 167, 197} Блеомицин (A) с фототрансформированным остатком битиазола (4,4'-связь между тиазольными кольцами вместо 2,4') проявлял практически идентичную с природным блеомицином сайт-специфичность.^{198, 199}

Вместе с этим появились данные, свидетельствующие о влиянии металлсвязывающего центра на сиквенс-специфичность расщепления. Например, расщепление самокомплементарного додекануклеотида CGCTTTAAAGCG блеомицином осуществляется в последовательностях GC (подчеркнуты), причем преимущественно расщепляется остаток C(3).¹¹⁹ Удаление из молекулы блеомицина дисахаридного остатка (дегликоблеомицин — D) или карбамоильной группы D-маннозы (декарбамоилблеомицин — C) не меняет сиквенс-специфичности расщепления в случае данного олигонуклеотида. Однако преимущественным сайтом расщепления становится остаток C(11).^{200, 201} По данным работы²⁰² карбамоильная группа D-маннозы может участвовать в хелатировании иона железа в металлсвязывающем центре антибиотика. Ее удаление должно сказаться на координационной сфере металла, что подтверждается данными ЯМР.²⁰³ Таким образом, смена предпочтительного сайта расщепления додекануклеотида обусловлена, по-видимому, изменениями в металлсвязывающем центре деглико- и декарбамоилблеомицина.

Факты, свидетельствующие о влиянии геометрии металлсвязывающего центра на сиквенс-специфичность расщепления ДНК, также можно найти в работе²⁰⁴. Авторы исследовали деградацию трех рестрикционных фрагментов ДНК, проходящую под воздействием разных производных блеомицина. Блеомицин B₂, дегликоблеомицин A₂ (D) и изоблеомицин A₂ (E), несущий карбамоильную группу в положении 2 D-маннозы²⁰⁵ (у природного блеомицина она находится в положении 3), демонстрировали идентичную блеомицину A₂ сиквенс-специфичность. В то же время для эпibleомицина A₂, отличающегося от блеомицина A₂ конфигурацией хирального углеродного атома у заместителя в положении 2 пиримидинового кольца (отмечен звездочкой), и, следовательно, ориентацией пропионамидного остатка относительно металлсвязывающего центра,²⁰⁶ характер расщепления заметно менялся. Эпibleомицин A₂ эффективно расщеплял гуанозин в последовательности TG, что совершенно не характерно для природного блеомицина; процент расщепления последовательностей CT и GG также был выше. Последовательности AT, TT, TC и GC расщеплялись слабее. Декарбамоилблеомицин A₂ (C) совсем не расщеплял последовательности AA, AC и CT, которые являются сайтами слабого расщепления для блеомицина A₂. Блеомициновая кислота не только гораздо слабее расщепляла ДНК (35% относительно блеомицина A₂), но и изменяла сиквенс-специфичность. Основными расщепляемыми последовательностями были GT и GA, а не GT и GC, относительно высоким был процент расщепления и для последовательности CT.²⁰⁴

Природа хелатируемого металла (Cu, Co, Mn) также оказывает влияние на специфичность действия антибиотика.^{59, 207–209} Комплекс Cu(II)Blm в присутствии дитиотрептола способен эффективно расщеплять ДНК с сайт-специфичностью, отличной от таковой для Fe(II)Blm. Разница в специфичности расщепления ДНК Fe(II)- и Cu(II)-комплексами блеомицина особенно резко проявляется при обработке 127-звенного двухцепочечного фрагмента ДНК SV40 (см.²⁰⁷). К сожалению, авторы не приводят данных по эффективности расщепления конкретных динуклеотидных последовательностей. Любопытно отметить, что расщепление ДНК комплексом Cu(II)–дегликоблеомицин эффективнее, чем комплексом Cu(II)–декарбамоилблеомицин, в то время как для Fe(II)-зависимого расщепления наблюдается обратная закономерность.²⁰⁰ Заслуживает внимания тот факт, что комплекс изоблеомицина A₂ с Fe(II) эффективно расщепляет ДНК,²⁰⁴ а комплекс с Cu(II) абсолютно не активен.²⁰⁷

Специфичность расщепления ДНК, проявляемая комплексами блеомицина с трехвалентным кобальтом при облучении УФ-светом, несколько отличается от специфичности расщепления железосодержащими комплексами блеоми-

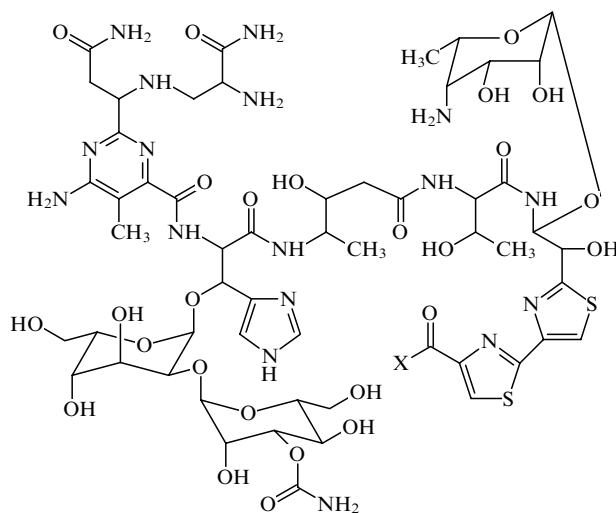
цина.^{59, 208} В этих работах также отсутствует статистический анализ сиквенс-специфичности действия Со(III)-комплексов антибиотика. Из представленных данных можно лишь выделить несомненное предпочтение последовательностей GT и GA и менее эффективное расщепление последовательности GC.

О природе сиквенс-специфичности действия блеомицина ценную информацию дают работы по исследованию блеомицинов, содержащих значительные структурные изменения. В одной из таких работ²¹⁰ были синтезированы аналоги дегликодеметилблеомицина A₂ (см. ниже), несущие вместо треонина остатки глицина (Gly)_n, где $n = 0-2$ и 4, и исследована их расщепляющая способность. Оказалось, что сиквенс-специфичность таких аналогов лишь незначительно отличается от специфичности блеомицина. Однако эффективность расщепления была гораздо ниже, чем у природного дегликодеметилблеомицина A₂. Так, аналог с $n = 0$ практически не расщеплял ДНК, а аналоги с $n = 1$ и 2, имеющие максимальную эффективность расщепления, достигали сравнимого с природным антибиотиком уровня деградации ДНК только при концентрации в 10–20 раз выше.^{188, 210}

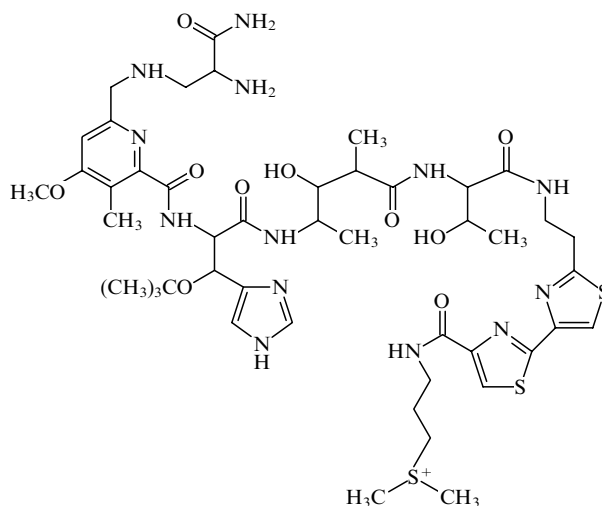
Из полученных результатов авторы сделали вывод, что металлсвязывающий домен играет определяющую роль в сиквенс-специфичности расщепления ДНК. Однако такой однозначный вывод уместен лишь если рассматривать молекулу блеомицина механистически, как было принято в конце 70-х годов: С-концевой фрагмент связывается специфически с ДНК, и если менять длину связующего звена между ним и разрезающим (металлсвязывающим) доменом, то должна меняться специфичность расщепления. Если этого не наблюдается, то ситуация меняется: металлсвязывающий домен определяет специфичность, а С-концевой фрагмент — сродство к ДНК.

Ранее уже было сказано, что блеомицин очень чувствителен к структуре расщепляемого субстрата. Высокая селективность окисления углеродного атома в положении 4' дезоксирибозы свидетельствует о тонкой подстройке блеомицина к конформации двойной спирали. Исходя из этого можно предположить, что изменение связующего звена ведет к неудачному для расщепления расположению металлсвязывающего центра, в результате чего происходит в основном самодеструкция, а не окисление ДНК. Или неудачное расположение металлсвязывающего центра вместо дополнительной стабилизации связывания за счет электростатических взаимодействий может привести к уменьшению сродства модифицированного антибиотика к полимеру, что также может быть причиной низкой эффективности расщепления. И наконец, во всех предыдущих рассуждениях остаток треонина рассматривался только как часть связующего звена, которая не участвует в связывании или определении сиквенс-специфичности расщепления. Тем не менее можно предположить, что свободная группа OH образует внутри- или межмолекулярные водородные связи, внося свой вклад в сиквенс-специфическое действие блеомицина.

Известно, что родственный блеомицину таллизомин,²¹¹ который дополнительно имеет две группы OH в алифатической цепи положения 2' остатка битазола и присоединенный к одной из этих OH-групп остаток аминосахара — таллозы, менее эффективно индуцирует образование одноцепочечных разрывов и обладает отличной от блеомицина сиквенс-специфичностью.^{173, 212, 213} Так, расщепление суперскрученной ДНК бактериофага PM2 таллизоминном осуществляется в 5–10 раз менее эффективно, чем блеомицином.^{53, 214} При этом таллизомин гораздо эффективнее расщепляет последовательности GA,^{166, 167, 197} и наиболее предпочтительными для него являются последовательности GT и GA.¹⁶⁸ Это указывает на участие С-концевого фрагмента молекулы блеомицина в определении специфичности и эффективности расщепления ДНК.



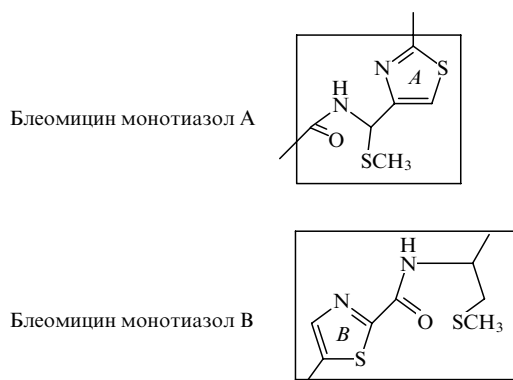
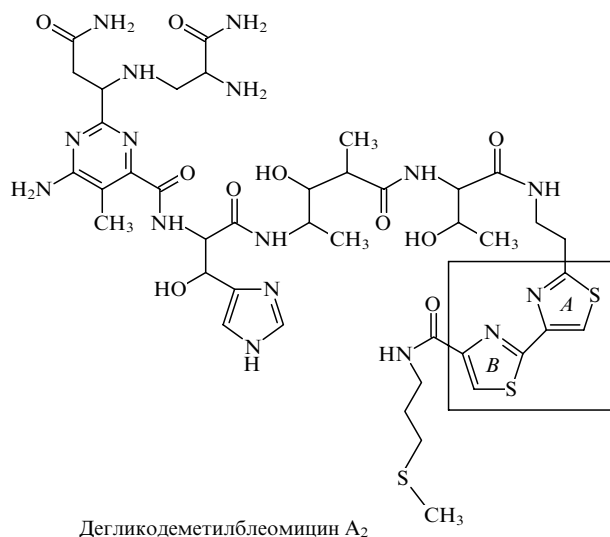
Таллизомин



Blm-PYLM(6)

О возможности С-концевого фрагмента молекулы определять сиквенс-специфичность убедительно свидетельствуют данные ряда работ, выполненных японскими исследователями.^{215, 216} Вначале ими был синтезирован аналог металлсвязывающего центра блеомицина, в котором 4-аминопиридиновое кольцо было замещено на 4-метокси-пиридин, а дисахаридный остаток — на *трет*-бутильную группу, и отсутствовал карбаомилметильный остаток в 2-заместителе пиридина. Такое соединение в присутствии ионов железа с эффективностью, сравнимой с природным блеомицином, активировало молекулярный кислород и было способно окислять низкомолекулярные органические субстраты.^{215, 216} При присоединении к данному соединению С-концевого фрагмента молекулы блеомицина A₂ (Blm-PYLM(6)) появлялась ДНК-деградирующая активность,^{217, 218} несмотря на то, что металлсвязывающий домен был существенно изменен. Исследования получили дальнейшее развитие, и была синтезирована молекула, включающая металлсвязывающий центр, 4-аминопентановую кислоту в качестве линкера и остаток дистамицина А вместо С-концевого трипептида S (см.²¹⁹). Полученная молекула весьма эффективно расщепляла ДНК (сравнимо с природным блеомицином), и максимальное расщепление приходилось на участки, богатые последовательностями AT, с которыми прочно связывается дистамицин А (см.²²⁰). При этом не наблюдалось никакой специфичности к последовательностям GT и GC, характерным для расщепления блеомицином.

Работа²²¹ стала важной для выяснения того, какой, С- или N-концевой, фрагмент молекулы блеомицина является определяющим сиквенс-специфичность действия антибиотика. Авторами были синтезированы и испытаны, как ДНК-расщепляющие агенты аналоги природного дегликодемтилблеомицина A_2 , содержащие вместо одного из тиазольных колец (или *A* или *B*) фрагмент его биосинтетического предшественника — *S*-метил-L-цистеина.²²²



Оказалось, что такие аналоги, менее эффективно, чем природный дегликоблеомицин A_2 расщепляют суперскрученную ковалентно замкнутую и линейную двухцепочечную ДНК, и при расщеплении 5'- или 3'-меченой линейной двухцепочечной ДНК не наблюдается никакой различимой сиквенс-специфичности. Следовательно, синтетические аналоги расщепляют ДНК статистически в отличие от сиквенс-специфического расщепления природным антибиотиком. Таким образом, данная работа является весомым аргументом в пользу того, что битиазольный остаток определяет сиквенс-специфичность действия блеомицина, причем необходим именно би-, а не монотиазольный фрагмент.²²²

Недавно была выполнена еще одна работа в серии исследований, касающихся роли N- и С-концевых фрагментов антибиотика в узнавании определенных последовательностей ДНК.²²³ На этот раз был синтезирован ряд молекул, содержащих ДНК-связывающую и ДНК-расщепляющую группировки. В качестве ДНК-связывающей группировки был использован С-концевой фрагмент молекулы блеомицина A_2 или демтилблеомицина A_2 , включающий остаток битиазола и концевой амин. К битиазолу через амидную связь была присоединена ДНК-расщепляющая группа — EDTA (остаток этилендиаминтетрауксусной кислоты). Если битиазольный фрагмент молекулы блеомицина полностью определяет направленность действия антибиотика, то такие

молекулы должны расщеплять ДНК вблизи гуанин-пиримидиновых последовательностей. Однако ярко выраженной сиквенс-специфичности расщепления, характерной для блеомицина, для таких модельных соединений обнаружено не было.²²³ К сожалению, авторы данной работы ничего не сообщают о связывании с ДНК синтезированных ими модельных соединений, а это представляется важным, если принять во внимание тот факт, что синтезированные соединения расщепляют ДНК гораздо менее эффективно (~10 раз), чем природный блеомицин. При этом эффективность расщепления аналогами, содержащими EDTA, сравнима с таковой для EDTA. Можно предположить, что при используемой авторами для демонстрации сиквенс-специфичности действия концентрации аналога 100 мкмоль $\cdot$ л⁻¹ повреждение ДНК осуществляется в основном диффузными радикалами $\cdot$ ОН, генерируемыми несвязанными с ДНК молекулами реагента. В таком случае сделанный авторами вывод в пользу определяющей сиквенс-специфичность роли N-концевого фрагмента молекулы антибиотика представляется не вполне доказанным.

Необходимо отметить еще одну важную для понимания природы сиквенс-специфичности деталь. В работе²¹⁹ расщепление аналогом блеомицина, содержащим дистамицин *A*, осуществляется по участкам, богатым последовательностями АТ. В то же время они являются участками связывания для дистамицина *A*, что свидетельствует о пространственной близости металлсвязывающего центра к ДНК-связывающей части молекулы. Молекулярные модели данного соединения указывают на возможность изгиба остатка, связывающего дистамицин *A* и металлсвязывающий центр, что обуславливает такую картину расщепления. Возможно, аналогичная ситуация создается при связывании с ДНК и расщеплении природным блеомицином, и тогда в сайт-специфическом узнавании ДНК могут принимать участие как С-, так и N-концевые фрагменты молекулы антибиотика.

Имеющиеся экспериментальные данные не позволяют сделать однозначного заключения о природе сиквенс-специфического действия блеомицина. Многие из них и особенно модель связывания в малой бороздке ДНК свидетельствуют о существенной роли С-концевого фрагмента молекулы в специфическом узнавании ДНК. Тем не менее не исключено, что одного С-концевого фрагмента не достаточно для сиквенс-специфического связывания и расщепления ДНК. Есть убедительные доказательства участия металлсвязывающего домена в предпочтительном выборе расщепляемой динуклеотидной последовательности. Не исключено, что здесь играет важную роль соответствие размеров металлсвязывающего центра и малой бороздки. Возможно, что остатки треонина и 4-амино-3-окси-2-метилпентановой кислоты, обеспечивая правильную пространственную ориентацию N- и С-концов молекулы, также вносят свой вклад в специфичность действия блеомицина. По-видимому, необходимо учитывать все три структурные составляющие для полного понимания природы сайт-специфичности. Такое рассмотрение должно включать в себя: аффинность к месту расщепления, обеспечиваемую в основном С-концевым фрагментом; микровариации структуры ДНК, обеспечивающие необходимый размер малой бороздки и оптимальное расположение связи C(4')—H дезоксирибозы для окисления гидропероксидным комплексом железа; возможность закрепления нужной для атаки ориентации металлсвязывающего центра с помощью связывающего остатка и(или) благодаря взаимодействиям N-концевой части молекулы с двойной спиралью. К этому можно добавить необходимость проникновения молекулы кислорода к хелатируемому иону железа, чему может способствовать дисахарид посредством образования гидрофобного кармана, и важность присутствия восстановителя для генерирования «активированного блеомицина». Выяснение перечисленных факторов, без сомнения, поможет полнее понять природу сайт-специфичности блеомицина.

5. Связь аффинности и эффективности расщепления

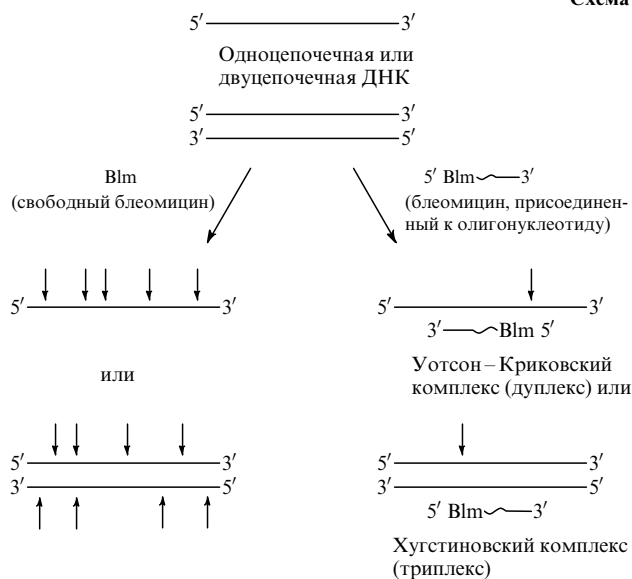
Расщеплению ДНК с помощью блеомицина, предшествует связывание антибиотика с полимером. При этом возникают вопросы: совпадают ли участки расщепления и связывания? Сколько пар оснований закрывает блеомицин при связывании? Определяется ли эффективность расщепления только сродством блеомицина к данному участку или на это также влияют другие факторы? В последнее время появились интересные данные, касающиеся поставленных вопросов. В частности, в работах^{126, 224–226} исследовалось расщепление ДНК различными эндонуклеазами в отсутствие и в присутствии комплексов блеомицина и флеомицина с Co(III) . Характер расщепления ДНК ДНКазой I и микрококковой нуклеазой в присутствии антибиотика заметно менялся. Радиоавтограф демонстрировал четкий защитный эффект по определенным участкам. Эти участки, как правило, содержали сайт расщепления комплексом Fe(II)Blm . При этом одна молекула блеомицина «закрывала» от действия эндонуклеаз 3–5 соседних пар оснований,^{126, 225} что соответствовало более ранним наблюдениям.¹²⁴ Авторы работы¹²⁶ попытались даже обосновать направление расположения молекулы блеомицина. Располагая данными ингибирования нуклеазного гидролиза на участке связывания – расщепления $5' \dots \text{ACGT} \dots 3'$ и считая, что одна молекула антибиотика перекрывает три пары оснований, они предположили, что блеомицин охватывает последовательность $5' \text{-CGT-} 3'$, т.е. молекула размещается у $5'$ -конца цепи относительно расщепляемого основания. В данной работе представлен еще один интересный результат. Оказывается, участки с чередующимися основаниями $(\text{AT})_n$, где $n = 3$, расщепляются блеомицином почти также же эффективно, как последовательности GT . В то же время комплекс Co(III)Blm не защищает эти участки от действия ДНКазы I. Иначе говоря, для таких участков характерно сильное расщепление при относительно слабом связывании. В участках $(\text{AT})_n$ расщепление происходило только в последовательностях AT , но не в TA . При этом участки $(\text{AAT})_n$, $(\text{ATT})_n$, $(\text{TTA})_n$, $(\text{TAA})_n$, $\text{A}_n \cdot \text{T}_n$ и отдельные AT -сайты практически не расщеплялись. Авторы предполагают, что этот феномен обусловлен необычной чередующейся конформацией В-формы в последовательностях $(\text{AT})_n$, где поворот спирали при шаге $5' \text{-TA-} 3'$ больше, чем при шаге $5' \text{-AT-} 3'$ (см.²²⁷). Возможно также, что изменению нормальной В-формы ДНК способствовала низкая ионная сила буферного раствора, в котором проводилось расщепление.^{126, 225, 226}

Таким образом, существует очевидная зависимость между прочным связыванием антибиотика с ДНК и эффективным расщеплением. Важным фактором является присутствие в последовательности оснований гуанина. На эффективность расщепления также значительное влияние оказывает локальная структура двойной спирали, которая должна находиться в форме В, а не в Z и не в А. Без сомнения, расщепление эффективнее протекает в чередующихся пуринопиримидиновых последовательностях, о чем свидетельствует предпочтение для расщепления последовательностей гуанин–пиримидин перед гуанин–пурином, тимин–пурином–пиримидин перед аденин–пурином–пиримидином и эффективное расщепление $(\text{AT})_n$. Суммируя сказанное выше, можно заключить, что эффективность расщепления зависит не только от прочности связывания, а определяется также структурой ДНК. В связи с этим расщепление блеомицином может быть использовано как чувствительный метод для определения микровариаций структуры двойной спирали.

IV. Блеомициновые производные олигонуклеотидов. Синтез и сайт-специфическое расщепление ДНК

Выше уже отмечалось (см. гл. I), что блеомицин, благодаря своей относительно низкой токсичности, широко используется для лечения опухолей плоскоклеточного происхождения как отдельно, так и в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами. Тем не менее применение блеомицина ограничено из-за поражения определенных тканей, в которых содержится мало фермента, инактивирующего антибиотик. Наиболее часто побочным эффектом употребления блеомицина бывает фиброз легких.^{13, 15, 228} Одним из путей повышения специфичности действия антибиотика в качестве терапевтического средства могло бы стать повышение его селективности в отношении определенных выбранных нуклеиновых кислот. Имеющаяся у природного блеомицина специфичность к динуклеотидным последовательностям не позволяет различать разные молекулы нуклеиновых кислот или разные участки одной макромолекулы. Увеличения специфичности действия антибиотика можно достичь, присоединив его к олигонуклеотиду. Пример такого присоединения представлен на схеме 3, где стрелками указаны места вероятного расщепления цепи ДНК. Это позволяет пространственно сблизить блеомицин с заранее выбранным участком НК и, тем самым, осуществить направленную химическую модификацию. Такой подход был впервые предложен в 60-х годах^{229, 230} и к настоящему времени получил широкое развитие.^{231–235}

Схема 3



Сейчас создан широкий спектр реакционноспособных производных олигонуклеотидов, несущих алкилирующие или фотоактивные группы, комплексы платины, способные координировать гетероциклы мишени, группировки, катализирующие окислительную деструкцию НК-мишени.^{231, 235} Последние могут хелатировать переходные металлы и, взаимодействуя с молекулярным кислородом, каталитически генерировать активные кислородсодержащие частицы, повреждающие ДНК. Существуют природные соединения, деструктурирующие ДНК подобным образом, к которым, в частности, относится противоопухолевый антибиотик блеомицин. Из представленных в гл. I–III данных можно предположить, что олигонуклеотиды, содержащие остаток этого антибиотика, будут эффективными сайт-специфическими реагентами, способными «выключать» функцию определенных генов. Однако сложная структура блеомицина, включающая несколько нуклеофильных центров, требует

специальных разработок для получения олигонуклеотидных производных блеомицина.

1. Синтез и свойства блеомициновых производных моно- и олигонуклеотидов

При конструировании блеомицинового производного олигонуклеотида, пригодного для сайт-специфической деградации ДНК-мишени, необходимо сохранить способность остатка антибиотика расщеплять ДНК и одновременно сохранить способность олигонуклеотидной части синтезируемого реагента образовывать комплементарные комплексы.

Для выполнения этих требований присоединение антибиотика к олигонуклеотиду проводили по 5'- или 3'-концевой фосфатной группе, предварительно активированной смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии 4-*N,N*-диметиламинопиридин-1-оксида (DMAPO) (схема 4). Известно, что полученная таким образом цвиттер-ионная фосфатная группа легко реагирует с алифатическими аминогруппами.²³⁶ Блеомицин A₅ содержит несколько алифатических аминогрупп. Аминогруппы металлизующего центра, необходимые для ДНК-расщепляющей активности антибиотика, защищали путем хелатирования с ионом меди, направляя тем самым присоединение по аминогруппам остатка спермидина на С-конце молекулы. Ранее уже было описано успешное применение медьсодержащего комплекса блеомицина для селективного ацилирования С-концевого аминного фрагмента.²³⁷ Во избежание присоединения двух молекул олигонуклеотида к одной молекуле антибиотика использовали 10-кратный избыток последнего.

Электронные спектры поглощения свидетельствуют о присутствии в синтезированных соединениях как олигонуклеотидной части, так и остатка антибиотика, при этом вклад в суммарный спектр каждой части соответствует присоединению одной молекулы антибиотика к одной молекуле олигонуклеотида.^{238, 239}

Окончательно структура блеомициновых производных олигонуклеотидов была определена методом ЯМР ¹³C (см.²⁴⁰). Установлено, что присоединение концевой фосфат-

ной группы олигонуклеотида происходит по первичной аминогруппе остатка спермидина блеомицина A₅ (см. схема 4).

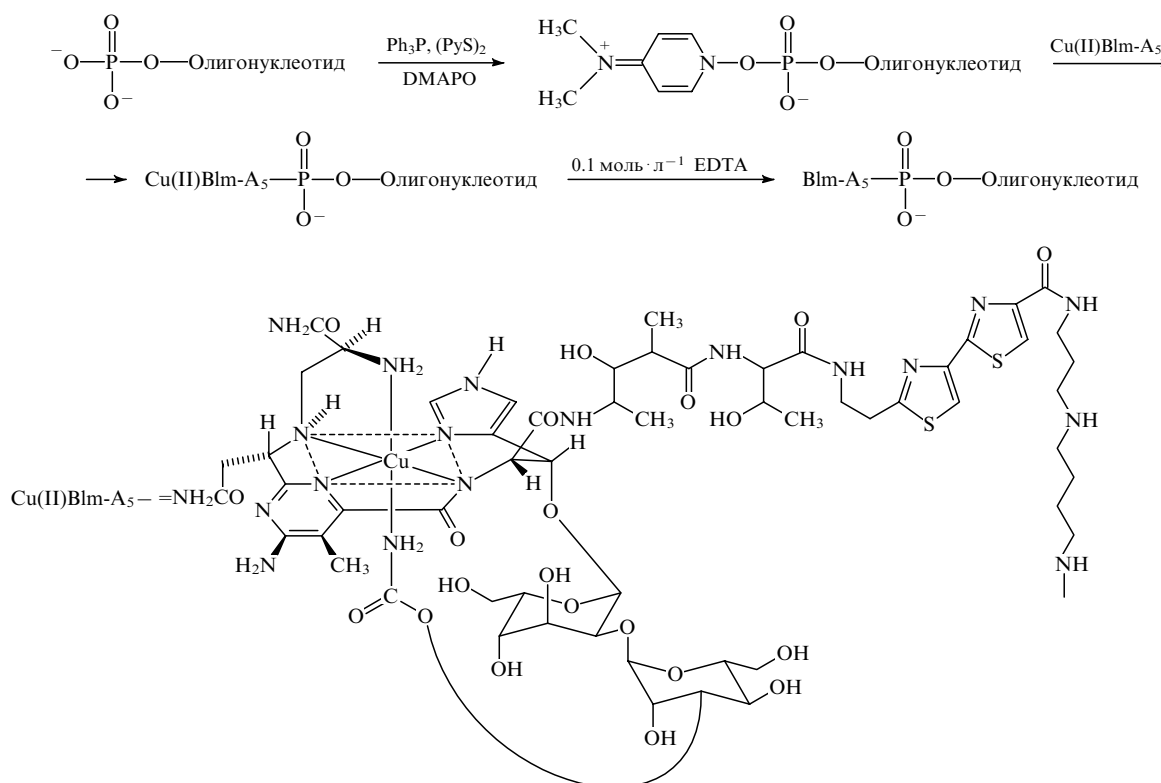
Как уже отмечалось ранее (см. табл. 1) блеомицин способен образовывать достаточно прочные комплексы ($K_b = 10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$) с двухцепочечной ДНК. Кроме того, связанный с ДНК антибиотик стабилизирует структуру двойной спирали. Так, температура плавления двухцепочечной ДНК тимуса теленка в присутствии блеомицина поднимается на 4°C (см.¹⁰⁴). Присоединение блеомицина к олигонуклеотиду должно стабилизировать образуемый им комплементарный комплекс. Действительно, температура плавления комплекса тетрадекануклеотида pd(TGTTTGGCGAAGGA) с блеомициновым производным комплементарного гептануклеотида Blm-A₅-pd(CCAACA) составляет 33°C, что на 11°C выше температуры плавления аналогичного комплекса, образованного с участием исходного гептануклеотида.^{238, 239} Это важный момент при осуществлении комплементарно-адресованного воздействия, так как эффективность такого воздействия на ДНК в большой мере зависит от стабильности комплементарного комплекса, образующегося между ДНК-мишенью и реагентом.²⁴¹

На следующем этапе была изучена ДНК-расщепляющая активность блеомициновых производных олигонуклеотидов.

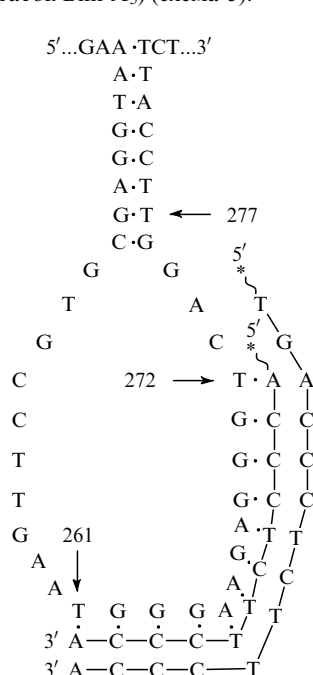
2. Сайт-специфическое расщепление одноцепочечного фрагмента ДНК блеомициновыми производными олигонуклеотидов

В работе²⁴² для исследования сайт-специфичности блеомициновых производных олигонуклеотидов был использован 302-звенный фрагмент ДНК, являющийся копией фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита. Два олигонуклеотидных реагента, содержащие остатки блеомицина A₅ на 5'-конце, направляли на участок последовательности 261–274, который преимущественно находится в одноцепочечной части

Схема 4



шпильки (звездочкой показан присоединенный к 5'-фосфату остаток BIm-A₅) (схема 5).^{243, 244}



Расщепление 302-звенной ДНК-мишени анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле. Данный метод позволяет отделить продукты расщепления от исходной ДНК-мишени и определить с точностью до одного основания место расщепления мишени. Последнее достигается сравнением электрофоретических подвижностей продуктов расщепления мишени реагентом и продуктов статистического расщепления цепи мишени по одному или двум основаниям по процедуре, предложенной Максамом и Гилбертом в 1979 г.¹⁶²

Результаты электрофоретического анализа свидетельствуют о том, что оба олигонуклеотидных реагента в условиях образования комплементарного комплекса индуцируют разрывы по ближайшим к месту расположения остатка антибиотика последовательностям GT мишени, а именно по T(272) и T(277) (рис. 2). Расщепление осуществляется с высокой эффективностью и селективностью. Так, при концентрации более короткого 12-звенного реагента, равной $1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л⁻¹ прямым разрывам (без дополнительной щелочной обработки, путь *a*, схема 2) по T(272) и T(277) подвергается 70% ДНК-мишени.

Наблюдаемое расщепление определяется сайт-специфическим связыванием олигонуклеотидной части реагентов с комплементарной последовательностью фрагмента ДНК. Это становится очевидным при рассмотрении расщепления данной ДНК блеомицином и блеомициновым производным олигонуклеотида с последовательностью оснований, не имеющей комплементарного участка связывания на выбранном фрагменте. Показано, что во-первых, оба эти реагента расщепляют ДНК-мишень с меньшей эффективностью, чем комплементарные реагенты, и по многим положениям, во-вторых, что положения T(272) и T(277) не являются предпочтительными сайтами расщепления.²⁴²

Очевидное свидетельство необходимости образования комплементарного комплекса для эффективной деструкции ДНК-мишени представлено на схеме 6 (стрелками обозначены основные места расщепления).²³⁹ Четырнадцатизвенная ДНК-мишень эффективно расщепляется семизвенным олигонуклеотидным реагентом BIm-A₅-pd(CCAACA) (схема 6, *a* (1)). В присутствии же комплементарной мишени тетрадекануклеотида реагент не способен образовать ком-

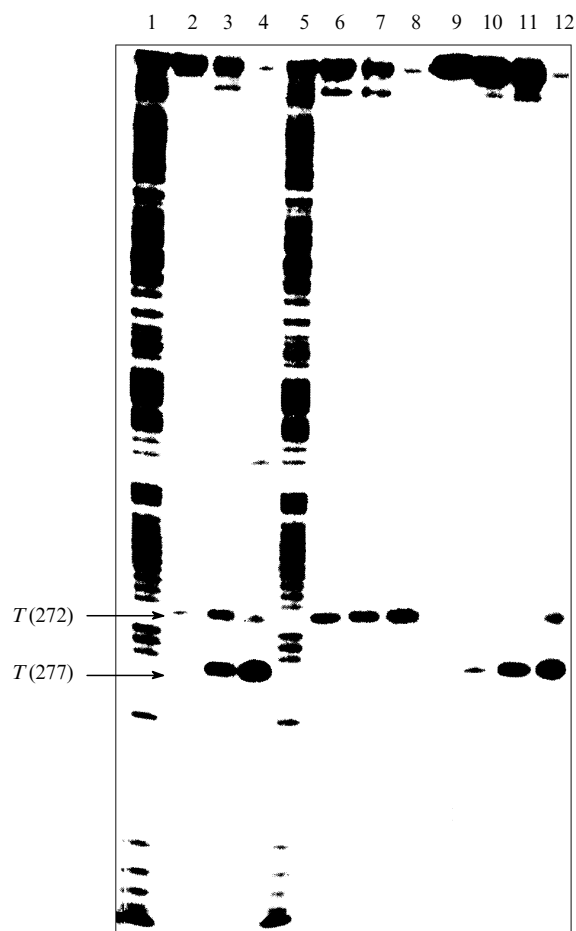
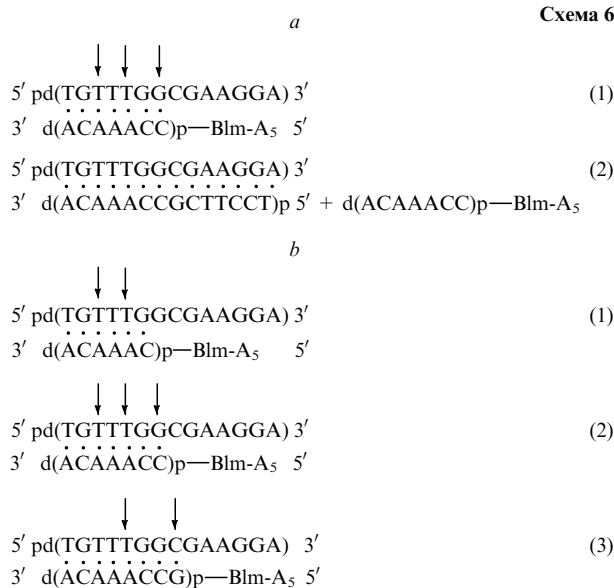


Рис. 2. Данные анализа продуктов расщепления 302-звенной 3'-³²P-меченой ДНК-мишени 12- и 14-звенными олигонуклеотидными реагентами. Дорожки 1, 5 — статистическое расщепление ДНК-мишени по остаткам пуринов,¹⁶² дорожки 2-4 — расщепление ДНК-мишени 12-звенным реагентом в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л⁻¹ соответственно; дорожки 6-8 — расщепление 14-звенным реагентом ($5 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹) в течение 1, 3 и 6 ч соответственно; дорожка 9 — ДНК-мишень, инкубированная в условиях реакции в отсутствие реагентов; дорожки 10-12 — расщепление 12-звенным реагентом ($5 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹) в течение 1, 3 и 6 ч соответственно

плементарный комплекс с мишенью и практически не расщепляет ее (схема 6, *a*(2)).

Комплементарные олигонуклеотидные реагенты разной длины имеют различную позиционную направленность расщепления. Основными местами расщепления в случае шестизвенного реагента являются T(5) и T(3) (схема 6, *b* (1)), в случае семизвенного реагента — G(7), T(5) и T(3) (схема 6, *b* (2)) и в случае восьмизвенного реагента — C(8) и T(5) (схема 6, *b* (3)). Интересно отметить, что при использовании семи- и восьмизвенных реагентов происходит расщепление мишени непосредственно по ближайшему к блеомицину нуклеотиду, вовлеченному в формирование комплементарного с реагентом комплекса (по остаткам G(7) и C(8) соответственно). В случае шестизвенного реагента ближайший нуклеотид (остаток G(6)) не расщепляется, а расщепление осуществляется по остатку T(5). Нуклеотид G(6) остается интактным и в случае действия семи- и восьмизвенных реагентов (схема 6, *b*).²³⁹ По-видимому, в данном случае на специфичность, которую определяет олигонуклеотидная часть реагентов, накладывается специфичность самого антибиотика, для которого нехарактерно расщепление в последовательности TG (см. гл. III).



Таким образом, изменение длины олигонуклеотидной части реагента ведет к изменению позиционной направленности расщепления, что указывает на сайт-специфический характер действия ковалентно присоединенного остатка блеомицина.

3. Деградиция двухцепочечной ДНК-мишени блеомициновыми производными олигонуклеотидов в составе триплекса

Одним из вариантов комплементарно-адресованной модификации является использование реакционноспособных производных олигонуклеотидов, которые могут воздействовать на выбранные участки двухцепочечной ДНК посредством формирования тройного комплекса.^{235, 247} Для такого воздействия были использованы олигонуклеотиды, содержащие алкилирующие^{246, 247} и фотоактивные группировки,²⁴⁸ а также группировки, обладающие окислительно-восстановительным механизмом действия.^{249, 250} В качестве реакционноспособной группировки был испытан остаток блеомицина А₅, хорошо зарекомендовавший себя при расщеплении ДНК-мишеней в двойном комплексе.²⁵¹

Выбор ДНК-мишени для изучения действия олигонуклеотидного реагента в составе тройного комплекса осуществлялся в соответствии со следующими требованиями. Во-первых, она должна содержать участок гомопуриновой и гомопиримидиновой последовательностей для формирования тройного комплекса. Во-вторых, прочный тройной комплекс должен образовываться при нейтральных рН, поскольку блеомицин эффективно расщепляет ДНК в пределах рН от 7 до 9.^{37, 62, 63} При таких условиях образуются прочные тройные комплексы состава Т·АТ.^{252, 253} В-третьих, фрагмент, участвующий в образовании комплекса с реагентом, должен быть прикрыт последовательностями, которые будут являться мишенью для воздействия остатка блеомицина при формировании тройного комплекса. Блеомицин вызывает расщепление ДНК преимущественно в последовательностях GT, GC, AT и GA по дезоксирибозе второго нуклеотида (гл. III). Исходя из этого была выбрана 30-звенная двухцепочечная мишень, представленная на схеме 7 (стрелками обозначены места расщепления; длина стрелок пропорциональна интенсивности расщепления).

5' и 3'-Блеомициновые производные 16-звенного олигонуклеотида в условиях образования тройного комплекса индуцируют расщепление мишени. Оба реагента осуществляют расщепление по обеим цепям вблизи расположения остатка антибиотика при связывании третьей цепи (реагента)

Схема 6

параллельно богатой пурином (триплекс I) и антипараллельно богатой пиримидином (триплекс II) последовательностям. Это согласуется с литературными данными^{249, 250} по расщеплению двухцепочечной ДНК EDTA- и 1,10-фенантролинсодержащими олигонуклеотидными реагентами, образующими с ней тройной комплекс.

Расщепление 3'-блеомициновым производным гексадекатимидилата богатой пиримидином цепи наблюдается как в районе 5'-конца олиго(Т)-тракта, что обусловлено образованием тройного комплекса, так и в районе 3'-конца цепи (схема 7). Данное расщепление происходит по участкам С(30), С(28) и Т(26) в последовательностях GC и GT, которые являются предпочтительными для связывания и расщепления самим блеомицином (гл. III). В условиях 5-кратного избытка реагента по сравнению с мишенью такое расщепление может быть обусловлено способностью остатка блеомицина связываться с двухцепочечной ДНК без формирования триплекса олигонуклеотидной частью реагента. Для проверки данного предположения было проведено расщепление ДНК-мишени 5'-блеомициновым производным 16-звенного олигонуклеотида Blm-A₅—pd(CAGCGGGATGCAACAC), заведомо не образующего тройной комплекс с мишенью. При этом богатая пурином цепь расщепляется незначительно (6%), а богатая пиримидином цепь, как и в случае блеомициновых производных гексадекатимидилата, расщепляется на 3'-конце по участкам С(30), С(28) и Т(26) (16%). Это свидетельствует о том, что воздействие на двухцепочечную ДНК-мишень 5'- и 3'-блеомициновыми производными гексадекатимидилата при 5-кратном избытке последних осуществляется как сайт-специфически за счет адресовки олигонуклеотидом при образовании тройного комплекса, так и неспецифически за счет связывания остатка блеомицина с двухцепочечной ДНК.

Схема 7



Сравнивая общие степени расщепления двухцепочечной ДНК-мишени блеомицинсодержащими реагентами (табл. 2), можно заключить, что как для 5'-, так и для

Таблица 2. Общие степени расщепления 30-звенной двухцепочечной ДНК-мишени блеомициновыми производными олигонуклеотидов

Реагент	Общая степень расщепления, %	
	А-богатой цепи	Т-богатой цепи
Blm-A ₅ -p(dT) ₁₆	25	47
(dT) ₁₆ p-Blm-A ₅	35	36
Blm-A ₅ -pd(CAGCGGGATGCAACAC) ^a	6	16

^a Не образует тройной комплекс с ДНК-мишенью.

3'-блеомициновых производных гексадекатимидилата сайт-специфическое расщепление, обусловленное образованием тройного комплекса, преобладает над неспецифическим.

4. Каталитическая деградация ДНК-мишени блеомициновым производным олигонуклеотида

Преимущество использования для сайт-специфической модификации ДНК группировок, обладающих окислительно-восстановительным механизмом действия, таких как Fe(III)-EDTA, металлопорфиринов или Cu(II)-1,10-фенантролина, перед алкилирующими или фотоактивируемыми группировками состоит в их способности каталитически продуцировать активные кислородсодержащие частицы и, следовательно, в возможности многократно воздействовать на ДНК-мишень.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Ярким представителем в ряду группировок окислительно-восстановительного механизма действия является гликопептидный антибиотик блеомицин. Циклическое окисление-восстановление иона железа, хелатированного в металлсвязывающем центре блеомицина, молекулярным кислородом и каким-либо восстанавливающим агентом ведет к многократному образованию «активированного блеомицина» и, как следствие, к каталитическому окислению органических субстратов.^{56, 257, 258} В процессе восстановления кислорода антибиотик выступает как фермент с ионом железа в качестве кофактора.^{56, 259} В недавнем сообщении²⁶⁰ приводятся данные, что одна молекула блеомицина в присутствии аскорбата способна катализировать восстановление 4.7 молекул кислорода. Главное достоинство блеомицина как реакционноспособной группировки для сайт-специфического расщепления ДНК, состоит в его способности каталитически окислять не только малые субстраты, но и ДНК.^{201, 261}

Как уже упоминалось выше, все используемые для сайт-специфической модификации ДНК окислительно-восстановительные группировки способны каталитически восстанавливать молекулярный кислород. Однако возможность многократного повреждения ДНК, индуцируемого этими группировками в составе олигонуклеотидного реагента, до сих пор не была реализована. Одной из причин этого может быть случайный характер повреждения нуклеотидных остатков активными кислородсодержащими частицами, генерируемыми этими реагентами. Так, анализ с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектроскопией позволил зарегистрировать наличие большого количества модифицированных оснований по сравнению с числом прямых разрывов ДНК после обработки комплексами Fe(III)-EDTA и Cu(II)-1,10-фенантролином.^{262, 263} Аналогично значительное количество модифицированных оснований, и прежде всего модифицированного гуанина, образуется при обработке ДНК металлопорфиринами.²⁵⁶

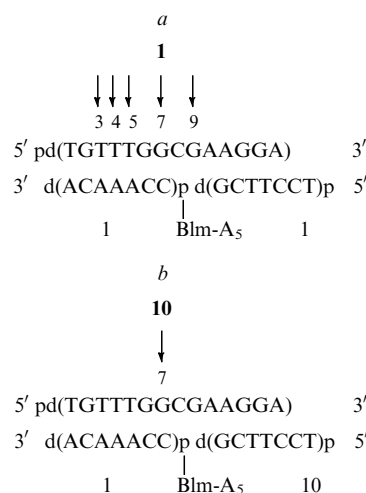
Модификации оснований не ведут к непосредственному расщеплению цепи ДНК. Более того, многие из модифицированных оснований, в частности 8-гидроксигуанин и 8-

гидроксиаденин, являющиеся основными продуктами при взаимодействии радикалов [•]ОН с пуриновыми гетероциклами, устойчивы в щелочных условиях, и даже обработка пиперидином не приводит к расщеплению сахаро-фосфатного остова в данных местах. Такие скрытые модификации маскируют каталитическую активность перечисленных реагентов.

Механизм эффективной деградации ДНК блеомицином существенно отличается от механизма деградации под действием окислительно-восстановительных группировок. Блеомицин вызывает селективное окисление атома C(4') дезоксирибозы, ведущее в физиологических условиях равновероятно к прямому разрыву цепи ДНК или образованию сайта, лабильного в щелочной среде (гл. III). Модификация оснований для этого антибиотика является лишь минорной реакцией.^{160, 161} Так, образование 8-гидроксигуанозина, основного побочного продукта, составляет 2-5% от количества окисленной дезоксирибозы.¹⁶⁰ Таким образом, блеомицин гораздо более селективно окисляет нуклеотидные остатки, чем его окислительно-восстановительные аналоги.

Не образуя ковалентных связей с ДНК после акта окисления дезоксирибозы, блеомицин способен связаться с новым участком ДНК и после восстановления иона железа в активном центре снова осуществить окисление сахаро-фосфатного остова. На протяженных ДНК было обнаружено, что одна молекула антибиотика вызывает образование нескольких молекул свободных гетероциклических оснований или пропеналей оснований.²⁶¹ Способность одной молекулы блеомицина деструктировать несколько молекул ДНК была показана при использовании в качестве мишеней олигонуклеотидов.²⁰¹

Для исследования способности остатка блеомицина в составе олигонуклеотидного конъюгата каталитически расщеплять ДНК была использована модель с эквимольным отношением мишень:реагент (схема 8,а) и с 10-кратным избытком мишени по отношению к реагенту (схема 8,б) (стрелками обозначены места расщепления).²⁶⁴

Схема 8

Известно, что блеомицин более эффективно расщепляет двухцепочечную ДНК, чем одноцепочечную.^{167, 265-267} Учитывая это обстоятельство, была выбрана модель, состоящая из 14-звенной ДНК-мишени, 5'-блеомицинового производного гептануклеотида и гептануклеотида, комплементарного 3'-концу мишени.

Каталитическая активность остатка блеомицина, ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду, может выражаться (в зависимости от условий) в повреждении нескольких молекул ДНК-мишени одной молекулой реагента или в неоднократном воздействии на одну и ту же мишень комплементарного комплекса.

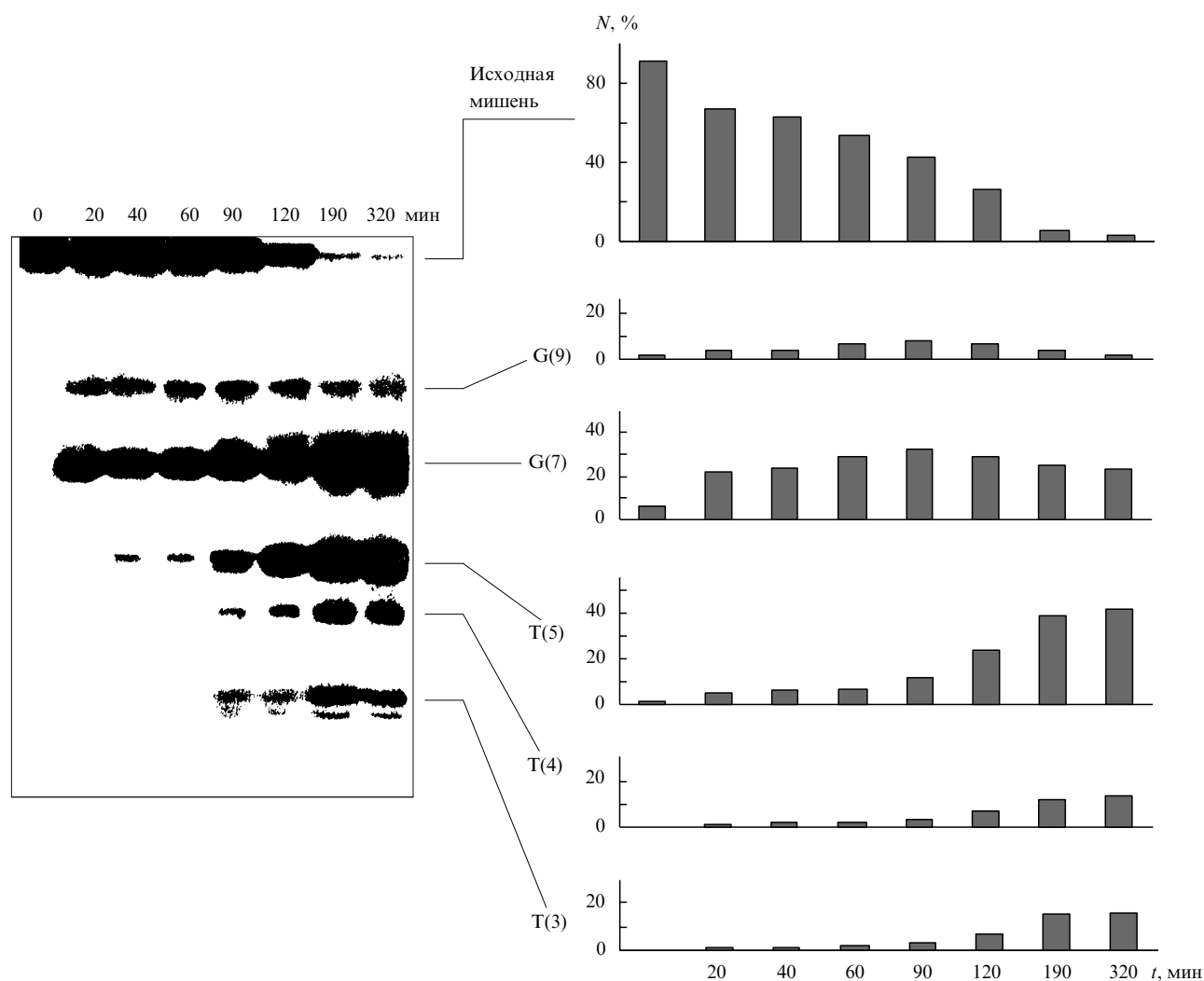


Рис. 3. Зависимость расщепления 14-звенной ДНК-мишени олигонуклеотидным реагентом (см. схему 8,а) от времени по данным электрофоретического и денситометрического анализа; концентрации олигонуклеотидных компонентов — $1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$; N — содержание продукта в реакционной смеси

а. Многократное расщепление 14-звенной ДНК-мишени блеомициновым производным олигонуклеотида

Воздействие блеомицинового производного олигонуклеотида на тетрадекануклеотид при их эквимольном соотношении (схема 8,а) приводит к практически полной деградации мишени (80%). При этом образуется широкий спектр продуктов расщепления и модифицируются сайты с T(3) по T(5), находящиеся довольно далеко от места ковалентного присоединения антибиотика. В то же время модификация в условиях 10-кратного избытка мишени идет преимущественно по G(7) (схема 8,б). Данный факт можно объяснить на основании каталитических свойств остатка антибиотика, которые в условиях эквимольного соотношения реагент:мишень могут выразиться в неоднократном воздействии на ДНК-мишень. Изучение временной зависимости деградации тетрадекануклеотида при 20°C показало, что в первую очередь атакуется положение G(7) мишени (рис. 3). Далее происходит накопление более коротких фрагментов мишени, образующихся при деструкции сайтов T(5), T(4) и T(3). При этом количество продукта расщепления по положению G(7) перестает накапливаться и со временем начинает уменьшаться. Аналогичные превращения претерпевает продукт расщепления по положению G(9). Это прямо указывает на то, что происходит неоднократная атака ДНК-мишени.

б. Деграция нескольких молекул мишени одной молекулой реагента

Для проявления каталитической активности блеомициновому производному олигонуклеотида необходимо переходить с одной молекулы мишени на другую. Это требует присутствия избытка мишени и подбора условий, при которых комплементарный комплекс реагент–мишень мог бы легко диссоциировать и в то же время быть достаточно стабильным для эффективной модификации. На рис. 4 представлены результаты расщепления ДНК-мишени реагентом при разных температурах в условиях, когда концентрация реагента была в 10 раз меньше по сравнению с концентрацией мишени и гептануклеотида. Максимальная степень расщепления мишени наблюдается в интервале 25–35°C, который включает в себя температуру плавления комплекса реагент–мишень ($T_{пл} = 33^\circ\text{C}$). В данных условиях легко протекает диссоциация реагента из комплементарного комплекса, что обеспечивает его переходы с одной молекулы мишени на другую; в то же время около половины молекул реагента находятся в комплементарном комплексе. Повышение температуры приводит к резкому падению степени расщепления, что, вероятно, связано с уменьшением концентрации комплементарного комплекса реагент–мишень. Понижение температуры приводит также к уменьшению степени расщепления мишени, что может быть связано с

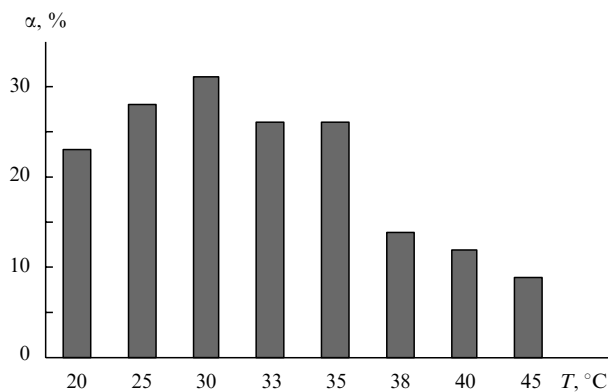


Рис. 4. Общая степень расщепления (α) 14-звенной ДНК-мишени ($1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) олигонуклеотидным реагентом ($1 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) в присутствии гептануклеотида ($1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) (см. схема 8, б) при разных температурах по данным денситометрического анализа

неоптимальными условиями для проявления каталитической активности реагента. Обнаружено, что при 30°C около 20% мишени претерпевает прямое расщепление, а дополнительная обработка пиперидином выявляет еще 10% образовавшихся сайтов, которые лабильны в щелочных условиях.²⁶⁴

Дегградация около 30% тетрадекануклеотида олигонуклеотидным реагентом в условиях 10-кратного избытка мишени свидетельствует о том, что одна молекула реагента способна атаковать в среднем три молекулы мишени. Ограничение эффективности действия реагента при наличии достаточного количества ионов железа, восстанавливающего агента и молекулярного кислорода может быть связано или с дегградацией его олигонуклеотидной части, или с дегградацией самого остатка антибиотика. Для выяснения причины ограничения каталитической активности был синтезирован 5'-³²P-меченный реагент и осуществлено расщепление немеченой ДНК-мишени в условиях 10-кратного избытка последней (схема 8, б). Данные электрофоретического анализа свидетельствуют о том, что в условиях каталитической дегградации мишени олигонуклеотидный реагент существенно разрушается.²⁶⁴ При отщеплении остатка антибиотика от реагента после проведения реакции был выделен немодифицированный олигонуклеотид. Следовательно, ограничение каталитической активности реагента связано с деструкцией самого антибиотика.

Таким образом, присоединение антибиотика к олигонуклеотиду позволяет адресовать его к выбранному участку одной из многих нуклеиновых кислот и тем самым существенно увеличить селективность его воздействия на совокупность последних. Описанный метод ковалентного присоединения блеомицина к олигонуклеотиду^{238,239} позволяет не только сохранять способность антибиотика к дегградации ДНК, но и свойственную свободному блеомицину способность к каталитическому типу действия.

Литература

1. H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami. *J. Antibiot.*, **19**, 200 (1966)
2. H. Umezawa, Y. Suhora, T. Takita, K. Maeda. *J. Antibiot.*, **19**, 210 (1966)
3. M. Ishizuka, H. Takayama, T. Takeuchi, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **20**, 15 (1967)
4. T. Ichikawa, A. Matsuda, K. Yamamoto, M. Tsubosaki, T. Kaihara, K. Sakamoto, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **20**, 149 (1967)
5. H. Umezawa, M. Ishizuka, K. Maeda, T. Takeuchi. *Cancer*, **20**, 891 (1967)

6. M. Suzuki, K. Nagai, H. Yamaki, N. Tanaka, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **21**, 379 (1968)
7. H. Umezawa, M. Ishizuka, K. Kimura, J. Iwanaga, T. Takeuchi. *J. Antibiot.*, **21**, 592 (1968)
8. M. Takeuchi, T. Yamamoto. *J. Antibiot.*, **21**, 631 (1968)
9. T. Ichikawa. In *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy. V.2*. (Proceedings of the 6th International Congress of Chemotherapy). University of Tokyo Press, Tokyo, 1970. P.288
10. M.B. Mosher, R.C. DeConti, J.R. Bertino. *Cancer*, **30**, 56 (1972)
11. R.A. Rudders. *Blood*, **40**, 317 (1972)
12. *Bleomycin Chemotherapy*. (Eds B.I. Sikis, M. Rozenzweig, S.K. Carter). Academic Press, Orlando, 1985
13. R.H. Blum, S.K. Carter, K. Agre. *Cancer*, **31**, 903 (1973)
14. S.S. Cohen. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M. Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.267
15. S.T. Crooke, W.T. Bradner. *J. Med.*, **7**, 333 (1976)
16. H. Umezawa. In *Antibiotics. Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents. V.3*. (Eds J.W. Corcoran, F.E. Hahn). Springer-Verlag, Berlin, 1975. P.21
17. W.E.G. Muller, R.K. Zahn. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. V.20*. (Ed. W.E. Cohn). Academic Press, London, 1977. P.21
18. H. Umezawa. *Lloydia*, **40**, 67 (1977)
19. S.M. Hecht. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M. Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.1
20. H. Umezawa. *Cancer Treat. Rep.*, **68**, 137 (1984)
21. M. Watanabe, Y. Takabe, T. Katsumata. *J. Antibiot.*, **26**, 417 (1973)
22. Z.I. Yamazaki, W.E.G. Muller, R.K. Zahn. *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 412 (1973)
23. G.P. Sartiano, A. Winkelstein, W. Lynch, S.S. Boggs. *J. Antibiot.*, **26**, 437 (1973)
24. R.S. Bornstein, D.A. Hungerford, G. Haller, P.F. Engstrom, J.W. Yarbrow. *Cancer Res.*, **31**, 2004 (1971)
25. T. Onishi, K. Shimada, Y. Takagi. *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 248 (1973)
26. M. Miyaki, T. Kitayama, T. Ono. *J. Antibiot.*, **27**, 647 (1974)
27. T. Takita, Y. Myraoka, T. Yoshioka, A. Fujii, K. Maeda, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **25**, 755 (1972)
28. T. Takita, Y. Myraoka, T. Nakatani, A. Fujii, Y. Umezawa, H. Naganawa, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **31**, 801 (1978)
29. T. Takita, Y. Umezawa, S.-I. Saito, H. Morishima, H. Naganawa, H. Umezawa, T. Tsuchiya, T. Miyake, S. Kageyama, S. Umezawa, Y. Myraoka, M. Suzuki, M. Otsuka, M. Narita, S. Kobayashi, M. Ohno. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 521 (1982)
30. K. Nagai, H. Yamaki, H. Suzuki, N. Tanaka, H. Umezawa. *Biochim. Biophys. Acta*, **179**, 165 (1969)
31. K. Nagai, H. Suzuki, N. Tanaka, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **22**, 569 (1969)
32. K. Nagai, H. Suzuki, N. Tanaka, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **22**, 624 (1969)
33. H. Suzuki, K. Nagai, H. Yamaki, N. Tanaka, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **22**, 446 (1969)
34. H. Suzuki, K. Nagai, E. Akutsu, H. Yamaki, N. Tanaka, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **23**, 473 (1970)
35. E.A. Sausville, J. Peisach, S.B. Horwitz. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 814 (1976)
36. E.A. Sausville, J. Peisach, S.B. Horwitz. *Biochemistry*, **17**, 2740 (1978)
37. E.A. Sausville, R.W. Stein, J. Peisach, S.B. Horwitz. *Biochemistry*, **17**, 2746 (1978)
38. M. Chien, A.P. Grollman, S.B. Horwitz. *Biochemistry*, **16**, 3641 (1977)
39. T. Takita, Y. Myraoka, T. Nakatani, A. Fujii, Y. Iitaka, H. Umezawa. *J. Antibiot.*, **31**, 1073 (1978)
40. J.D. Glickson, R.P. Pillai, T.T. Sakai. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2967 (1981)
41. D.H. Petering, R.W. Byrnes, W.E. Antholine. *Chem.-Biol. Interact.*, **73**, 133 (1990)
42. J.C. Dabrowiak, F.T. Greenaway, W.E. Longo, M. van Husen, S.T. Crooke. *Biochim. Biophys. Acta*, **517**, 517 (1978)
43. J.C. Dabrowiak, F.T. Greenaway, F.S. Santillo. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M. Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.137
44. J.C. Dabrowiak. *J. Inorg. Biochem.*, **13**, 317 (1980)

45. Y.Sugiura, T.Suzuki, M.Otsuka, S.Kobayashi, M.Ohno, T.Takita, H.Umezawa. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1328 (1983)
46. A.Kittaka, Y.Sugano, M.Otsuka, S.Kobayashi, M.Ohno, Y.Sugiura, H.Umezawa. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3631 (1986)
47. L.F.Povirk, M.Hogan, N.Dattagupta. *Biochemistry*, **18**, 96 (1979)
48. L.F.Povirk, M.Hogan, N.Dattagupta, M.Buechner. *Biochemistry*, **20**, 665 (1981)
49. S.N.Roy, G.A.Orr, C.F.Brewer, S.B.Horwitz. *Cancer Res.*, **41**, 4471 (1981)
50. J.P.Albertini, A.Garnier-Suillerot. *Biochemistry*, **21**, 6777 (1982)
51. J.P.Albertini, A.Garnier-Suillerot. *Biochemistry*, **23**, 47 (1984)
52. H.Hiroaki, T.Nakayama, M.Ikehara, S.Uesugi. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2780 (1991)
53. J.E.Strong, S.T.Crooke. *Cancer Res.*, **38**, 3322 (1978)
54. C.-H.Huang, L.Galvan, S.T.Crooke. *Biochemistry*, **19**, 1761 (1980)
55. D.L.Boger, S.L.Colletti, T.Honda, R.F.Menezes. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5607 (1994)
56. W.J.Caspary, D.A.Lanzo, C.Niziak. *Biochemistry*, **21**, 334 (1982)
57. H.Kasai, H.Naganawa, T.Takita, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **31**, 1316 (1978)
58. T.T.Sakai, J.M.Riordan, J.D.Glickson. *Biochemistry*, **21**, 805 (1982)
59. C.-H.Chang, C.F.Meares. *Biochemistry*, **23**, 2268 (1984)
60. T.T.Sakai, J.M.Riordan, T.E.Booth, J.D.Glickson. *J. Med. Chem.*, **24**, 279 (1981)
61. 92. R.S.Magliozzo, S.Peisach, M.R.Ciriolo. *Mol. Pharmacol.*, **35**, 428 (1989)
62. H.Umezawa, H.Asakura, K.Oda, S.Hori. *J. Antibiot.*, **26**, 521 (1973)
63. H.Asakura, S.Hori, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **28**, 537 (1975)
64. M.Hori. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.195
65. B.J.Carter, E. de Vroom, E.S.Long, G.A. van der Marel, I.H. van Boom, S.M.Hecht. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9373 (1990)
66. J.Stubbe, J.W.Kozarich. *Chem. Rev.*, **87**, 1107 (1987)
67. D.M.Chen, T.T.Sakai, J.D.Glickson, D.J.Patel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 197 (1980)
68. R.P.Pillai, N.R.Krishna, T.T.Sakai, J.D.Glickson. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 270 (1980)
69. T.T.Sakai, J.M.Riordan, N.G.Kumar, F.J.Haberle, G.A.Elgavish, J.D.Glickson, A.Levy. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1**, 809 (1983)
70. T.T.Sakai, J.M.Riordan, J.D.Glickson. *Biochim. Biophys. Acta*, **758**, 176 (1983)
71. T.E.Booth, T.T.Sakai, J.D.Glickson. *Biochemistry*, **22**, 4211 (1983)
72. M.P.Gamsick, J.D.Glickson, G.Zon. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **7**, 1117 (1990)
73. H.Urata, Y.Ueda, Y.Usami, M.Akagi. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7135 (1993)
74. W.Wu, D.E.Vanderwall, J.Stubbe, J.W.Kozarich, C.J.Turner. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10843 (1994)
75. R.A.Manderville, J.F.Ellena, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10851 (1994)
76. J.Kross, W.D.Henner, W.A.Haseltine, L.Rodriguez, M.D.Levin, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **21**, 3711 (1982)
77. L.M.Fisher, R.Kuroda, T.T.Sakai. *Biochemistry*, **24**, 3199 (1985)
78. R.E.Kilkuskie, H.Suguna, B.Yellin, N.Murugesan, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 260 (1985)
79. E.Farinas, J.D.Tan, N.Baidya, P.K.Mascharak. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2996 (1993)
80. R.J.Guajardo, S.E.Hudson, S.J.Brown, P.K.Mascharak. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7971 (1993)
81. D.L.Boger, T.Honda, R.F.Menezes, S.L.Colletti. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5631 (1994)
82. Y.Muraoka, A.Fujii, T.Yoshioka, T.Takita, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **30**, 178 (1977)
83. Y.Sugiura, K.Ishizu, K.Miyoshi. *J. Antibiot.*, **32**, 453 (1979)
84. D.E.Berry, L.-H.Chang, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **24**, 3207 (1985)
85. M.J.Levy, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **27**, 2647 (1988)
86. W.E.Antholine, D.H.Petering, L.A.Saryan, C.E.Brown. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7517 (1981)
87. W.E.Antholine, D.H.Petering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 528 (1979)
88. Y.Sugiura, K.Ishizu. *J. Inorg. Biochem.*, **11**, 171 (1979)
89. R.M.Burger, J.Peisach, S.B.Horwitz. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11636 (1981)
90. Y.Sugiura. *J. Antibiot.*, **31**, 1206 (1978)
91. Y.Sugiura. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5216 (1980)
92. M.Chikara, W.E.Antholine, D.H.Petering. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21478 (1989)
93. Y.Iitaka, H.Nakamura, T.Nakatani, Y.Myraoka, A.Fujii, T.Takita, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **31**, 1070 (1978)
94. M.A.J.Akkerman, E.W.J.F.Nejman, S.S.Wijmenga, C.W.Hilbers, W.Bermel. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7462 (1990)
95. H.Shields, C.McGlumphy, P.J.Hamrick. *Biochim. Biophys. Acta*, **697**, 113 (1982)
96. M.Chikara, T.Sato, W.E.Antholine, D.H.Petering. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2859 (1991)
97. H.Shields, C.McGlumphy. *Biochim. Biophys. Acta*, **800**, 277 (1984)
98. G.Koyama, H.Nakamura, Y.Myraoka, T.Takita, K.Maeda, H.Umezawa, Y.Iitaka. *Tetrahedron Lett.*, 4635 (1968)
99. S.Neidle, Z.Abraham. *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.*, **17**, 73 (1984)
100. M.J.Waring. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 159 (1981)
101. T.Takita, Y.Myraoka, A.Fujii, H.Itoh, K.Maeda, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **25**, 197 (1972)
102. S.Y.Lin, A.P.Grollman. *Biochemistry*, **20**, 7589 (1981)
103. K.J.Miller, M.Lauer, W.Caloccia. *Biopolymer*, **24**, 913 (1985)
104. J.-P.Henichart, J.-L.Bernier, N.Helbecque, R.Houssin. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 6703 (1985)
105. K.H.Langley, M.R.Patel, M.J.Fournier. In *Biomedical Application of Laser Light Scattering*. (Eds D.B.Sattelle, W.I.Lee, B.R.Ware). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982. P.37
106. S.-J.Hong, L.H.Piette. *Cancer Res.*, **36**, 1159 (1976)
107. J.-L.Bernier, J.-P.Henichart, J.P.Catteau. *Anal. Biochem.*, **117**, 12 (1981)
108. T.R.Krugh, F.N.Wittlin, S.P.Cramer. *Biopolymers*, **14**, 197 (1975)
109. D.J.Patel. *Acc. Chem. Res.*, **12**, 118 (1979)
110. J.Feigon, W.A.Denny, W.Leupin, D.R.Kearns. *J. Med. Chem.*, **27**, 450 (1984)
111. W.D.Wilson, R.L.Jones. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 1399 (1982)
112. K.Wuthrich. In *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, New York, 1986. P.3
113. H.Murakami, H.Mori, S.Taira. *J. Theor. Biol.*, **59**, 1 (1976)
114. E.J.Gabbay, P.D.Adawadkar, W.D.Wilson. *Biochemistry*, **15**, 146 (1976)
115. R.Kuroda, S.Neidle, J.M.Riordan, T.T.Sakai. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4753 (1982)
116. J.M.Riordan, T.T.Sakai. *J. Med. Chem.*, **26**, 884 (1983)
117. R.E.Dickerson. In *Implication for Carcinogenesis and Risk Assessment in Basic Life Sciences. V.38*. (Eds M.G.Simic, L.Grossman, A.C.Upton). Plenum Press, New York, 1986. P.245
118. Y.Sugiura, T.Suzuki. *J. Biol. Chem.*, **257**, 10544 (1982)
119. H.Sugiyama, R.E.Kilkuskie, S.M.Hecht, G.A. van der Marel, J.H. van Boom. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7765 (1985)
120. K.Yamamoto, S.Kawanishi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 292 (1992)
121. H.M.Sobell, S.C.Jain. *J. Mol. Biol.*, **68**, 21 (1972)
122. T.Suzuki, J.Kuwahara, Y.Sugiura. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 916 (1983)
123. R.P.Hertzberg, M.J.Caranfa, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **27**, 3164 (1988)
124. J.Kuwahara, Y.Sugiura. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2459 (1988)
125. R.L.Petrusek, G.L.Anderson, T.F.Garner, Q.L.Fannin, D.J.Kaplan, S.G.Zimmer, L.H.Hurley. *Biochemistry*, **20**, 1111 (1981)
126. K.P.Nightingale, K.R.Fox. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2549 (1993)
127. H.Murakami, H.Mori, S.Taira. *J. Theor. Biol.*, **42**, 443 (1973)
128. T.Onishi, H.Iwata, Y.Takagi. *J. Biochem.*, **77**, 745 (1975)
129. R.Ishida, T.Takahashi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1432 (1975)
130. J.W.Lown, S.-K.Sim. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1150 (1977)
131. J.W.Lown. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.184
132. Y.Sugiura. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5208 (1980)
133. Y.Sugiura, T.Kikushi. *J. Antibiot.*, **31**, 1310 (1978)
134. L.W.Oberley, G.R.Buettner. *FEBS Lett.*, **97**, 47 (1979)
135. J.W.Lown, A.V.Joashua. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 521 (1979)

136. L.Galvan, C.-H.Huang, A.W.Prestayko, J.T.Stout, J.E.Evans, S.T.Crooke. *Cancer Res.*, **41**, 5103 (1981)
137. L.O.Rodriguez, S.M.Hecht. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1470 (1982)
138. R.M.Burger, J.Peisach, W.E.Blumberg, S.B.Horwitz. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10906 (1979)
139. H.Kuramoshi, K.Takahashi, T.Takita, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **34**, 576 (1981)
140. G.Pratviel, J.Bernadou, B.Meunier. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 133 (1989)
141. A.Natrajan, S.M.Hecht, G.A. van der Marel, J.H. van Boom. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3397 (1990)
142. A.Natrajan, S.M.Hecht, G.A. van der Marel, J.H. van Boom. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4532 (1990)
143. J.W.Sam, X.-J.Tang, J.Peisach. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5250 (1994)
144. S.M.Hecht. *Acc. Chem. Res.*, **19**, 383 (1986)
145. Д.Г.Кнорре, О.С.Федорова, Е.И.Фролова. *Успехи химии*, **62**, 70 (1993)
146. L.Giloni, M.Takeshita, F.Johnson, C.Iden, A.P.Grollman. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8608 (1981)
147. J.C.Wu, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4694 (1983)
148. J.C.Wu, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *Biochemistry*, **24**, 7562 (1985)
149. J.W.Kozarich, L.J.Worth, B.L.Frank, D.A.Christner, D.E.Vanderwall, J.Stubbe. *Science*, **245**, 1396 (1989)
150. L.J.Worth, B.L.Frank, D.A.Christner, M.J.Absalon, J.Stubbe, J.W.Kozarich. *Biochemistry*, **32**, 2601 (1993)
151. S.Uesugi, T.Shida, M.Ikehara, Y.Kobayashi, Y.Kyogoku. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 1581 (1984)
152. N.Murugesan, C.Xu, G.M.Ehrenfeld, H.Sugiyama, R.E.Kilkuskie, L.O.Rodriguez, L.-H.Chang, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **24**, 5735 (1985)
153. L.E.Rabow, G.H.McGall, J.Stubbe, J.W.Kozarich. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3203 (1990)
154. J.C.Wu, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *Biochemistry*, **24**, 7569 (1985)
155. H.Sugiyama, C.Xu, N.Murugesan, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4104 (1985)
156. H.Sugiyama, C.Xu, N.Murugesan, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **27**, 58 (1988)
157. L.E.Rabow, J.Stubbe, J.W.Kozarich. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3196 (1990)
158. R.M.Burger, J.Peisach, S.B.Horwitz. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3372 (1982)
159. M.J.Absalon, C.R.Krishnamoorthy, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4179 (1992)
160. E.Gajewski, O.I.Aruoma, M.Dizdaroglu, B.Halliwell. *Biochemistry*, **30**, 2444 (1991)
161. K.Kohda, H.Kasai, T.Ogawa, T.Suzuki, Y.Kawazoe. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1028 (1989)
162. A.M.Maxam, W.Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560 (1977)
163. A.D.D'Andrea, W.A.Haseltine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3608 (1979)
164. M.Takeshita, A.P.Grollman, E.Ohtsubo, H.Ohtsubo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5983 (1979)
165. L.F.Povirk, W.Kohnlein, F.Hutchinson. *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 126 (1978)
166. C.K.Mirabelli, W.G.Beattie, C.-H.Huang, A.W.Prestayko, S.T.Crooke. *Cancer Res.*, **42**, 1399 (1982)
167. J.Kross, D.W.Henner, S.M.Hecht, W.A.Haseltine. *Biochemistry*, **21**, 4310 (1982)
168. C.K.Mirabelli, A.Ting, C.-H.Huang, S.Mong, S.T.Crooke. *Cancer Res.*, **42**, 2779 (1982)
169. V.Murray, R.F.Martin. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1467 (1985)
170. R.S.Lloyd, C.W.Haidle, D.L.Robberson. *Biochemistry*, **17**, 1890 (1978)
171. R.S.Lloyd, C.W.Haidle, D.L.Robberson. *Gene*, **7**, 289 (1979)
172. R.S.Lloyd, C.W.Haidle, D.L.Robberson. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.222
173. C.K.Mirabelli, C.-H.Huang, S.T.Crooke. *Biochemistry*, **22**, 300 (1983)
174. J.E.Grimwade, E.B.Cason, T.A.Beerman. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6315 (1987)
175. P.K.Mascharak, Y.Sugiura, J.Kuwahara, T.Suzuki, S.J.Lippard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6795 (1983)
176. B.Gold, V.Dange, M.A.Moore, A.Eastman, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2347 (1988)
177. L.D.Williams, I.H.Goldberg. *Biochemistry*, **27**, 3004 (1988)
178. V.Murray, L.Tan, J.Matthews, R.F. Martin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 12854 (1988)
179. R.P.Hertzberg, M.J.Caranfa, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **24**, 5285 (1985)
180. M.Bene, G.Felsenfeld. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1619 (1981)
181. E.C.Long, S.M.Hecht, G.A. van der Marel, J.H. van Boom. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5272 (1990)
182. W.E.G.Muller, Z.-I.Yamazaki, H.J.Breter, R.K.Zahn. *Eur. J. Biochem.*, **31**, 518 (1972)
183. M.T.Kuo, L.T.Auger, G.F.Saunders, C.W.Haidle. *Cancer Res.*, **37**, 1345 (1977)
184. C.W.Haidle, J.Jr.Bearden. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 815 (1975)
185. C.R.Krishnamoorthy, D.E.Vanderwall, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2008 (1988)
186. C.W.Haidle, M.T.Kuo, K.K.Weiss. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 3308 (1972)
187. B.J.Carter, K.S.Reddy, S.M.Hecht. *Tetrahedron*, **47**, 2463 (1991)
188. B.J.Carter, C.E.Holmes, R.B. van Atta, V.Dange, S.M.Hecht. *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 215 (1991)
189. A.Huttenhofer, S.Hudson, H.F.Noller, P.K.Mascharak. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24471 (1992)
190. M.J.Absalon, C.R.Krishnamoorthy, G.McGall, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4179 (1992)
191. C.E.Holmes, B.J.Carter, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **32**, 4293 (1993)
192. R.J.Duff, E. de Vroom, A.Geluk, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3350 (1993)
193. C.E.Holmes, S.M.Hecht. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25909 (1993)
194. S.M.Hecht. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 513 (1994)
195. M.A.Morgan, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **33**, 10286 (1994)
196. M.Takeshita, A.P.Grollman. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.207
197. M.Takeshita, L.S.Kappen, A.P.Grollman, M.Eisenberg, I.H.Goldberg. *Biochemistry*, **20**, 7599 (1981)
198. T.Morii, T.Matsuura, I.Saito, T.Suzuki, J.Kuwahara, Y.Sugiura. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7089 (1986)
199. T.Morii, I.Saito, T.Matsuura, J.Kuwahara, Y.Sugiura. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 938 (1987)
200. H.Sugiyama, G.M.Ehrenfeld, J.B.Shipley, R.E.Kilkuskie, L.-H.Chang, S.M.Hecht. *J. Nat. Prod.*, **48**, 869 (1985)
201. H.Sugiyama, R.E.Kilkuskie, L.-H.Chang, L.-T.Ma, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3852 (1986)
202. N.J.Oppenheimer, L.O.Rodrigues, S.M.Hecht. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5616 (1979)
203. N.J.Oppenheimer, C.Chang, L.-H.Chang, G.Ehrenfeld, L.O.Rodrigues, S.M.Hecht. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1606 (1982)
204. J.B.Shipley, S.M.Hecht. *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 25 (1988)
205. Y.Nakayama, M.Kunishima, S.Omoto, T.Takita, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **29**, 400 (1973)
206. M.Kunishima, T.Fujii, Y.Nakayama, T.Takita, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **29**, 853 (1976)
207. G.M.Ehrenfeld, J.B.Shipley, D.S.Heimbrook, H.Sugiyama, E.C.Long, J.H. van Boom, G.A. van der Marel, N.J.Oppenheimer, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **26**, 931 (1987)
208. M.J.McLean, A.Dar, M.J.Waring. *J. Mol. Recognit.*, **1**, 184 (1989)
209. T.Suzuki, J.Kuwahara, M.Goto, Y.Sugiura. *Biochim. Biophys. Acta*, **824**, 330 (1985)
210. B.J.Carter, V.S.Murty, K.S.Reddy, S.-N.Wang, S.M.Hecht. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4193 (1990)
211. M.Konishi, K.Saito, K.Numata, T.Tsuno, K.Asama, H.Tsukura, T.Naito, H.Kawaguchi. *J. Antibiot.*, **30**, 789 (1977)
212. C.K.Mirabelli, S.Mong, C.-H.Huang, S.T.Crooke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 871 (1979)
213. C.K.Mirabelli, C.-H.Huang, A.W.Prestayko, S.T.Crooke. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **8**, 57 (1982)
214. C.K.Mirabelli, S.Mong, C.-H.Huang, S.T.Crooke. *Cancer Res.*, **40**, 4173 (1980)
215. Y.Sugano, A.Kittaka, M.Otsuka, M.Ohno, Y.Sugiura, H. Umezawa. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3635 (1986)

216. A.Kittaka, Y.Sugano, M.Otsuka, M.Ohno. *Tetrahedron*, **44**, 2811 (1988)
217. M.Otsuka, A.Kittaka, M.Ohno, T.Suzuki, J.Kuwahara, Y.Sugiura, H.Umezawa. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3639 (1986)
218. A.Kittaka, Y.Sugano, M.Otsuka, M.Ohno. *Tetrahedron*, **44**, 2821 (1988)
219. M.Otsuka, T.Masuda, A.Haupt, M.Ohno, T.Shiraki, Y.Sugiura, K.Maeda. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 838 (1990)
220. M.L.Kopka, C.Yoon, D.Goodsell, P.Pjura, R.E.Dickerson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1376 (1985)
221. N.Hamamichi, A.Natrajan, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6278 (1992)
222. A.Fujii. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.75
223. S.A.Kane, A.Natrajan, S.M.Hecht. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10899 (1994)
224. K.R.Fox, G.W.Grigg, M.J.Waring. *Biochem. J.*, **243**, 847 (1987)
225. K.R.Fox. *Anti-Cancer Drug Des.*, **5**, 99 (1990)
226. K.P.Nightingale, K.R.Fox. *Biochem. J.*, **284**, 929 (1992)
227. A.Klug, A.Jack, O.Kennard, Z.Shakke, T.Steitz. *J. Mol. Biol.*, **131**, 669 (1979)
228. I.H.Raisfeld. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.324
229. A.M.Belikova, V.F.Zarytova, N.I.Grineva. *Tetrahedron Lett.*, 3557 (1967)
230. Н.И.Гринева. В кн. *Аффинная модификация биополимеров*. Наука, Новосибирск, 1983. С.187
231. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev. In *Soviet Scientific Reviews. V.12*. (Ed. M.B.Volpin). Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, 1989. P.271
232. J.Goodchild. *Bioconjugate Chem.*, **1**, 165 (1990)
233. C.Helene, J.-J.Toulme. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1049**, 99 (1990)
234. *Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS*. (Ed. E.Wickstrom). Wiley-Liss, New York, 1991
235. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev, O.S.Fedorova. In *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994
236. Т.С.Годовикова, В.Ф.Зарытова, Т.В.Мальцева, Л.М.Халимская. *Биорг. химия*, **15**, 1246 (1989)
237. T.Takita, A.Fujii, T.Fukuoka, H.Umezawa. *J. Antibiot.*, **26**, 252 (1973)
238. Т.С.Годовикова, В.Ф.Зарытова, Д.С.Сергеев. *Биорг. химия*, **17**, 1193 (1991)
239. V.F.Zarytova, D.S.Sergeyev, T.S.Godovikova. *Bioconjugate Chem.*, **4**, 189 (1993)
240. Д.С.Сергеев, А.Ю.Денисов, В.Ф.Зарытова. *Биорг. химия*, **21**, 695 (1995)
241. Г.Г.Карпова, Л.О.Козлова, Н.П.Пичко. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*, (3), 96 (1983)
242. D.S.Sergeyev, V.F.Zarytova, S.V.Mamaev, T.S.Godovikova, V.V.Vlassov. *Antisense Res. Dev.*, **2**, 235 (1992)
243. V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, I.V.Kutiavin, S.V.Mamaev, M.A.Podyminogin. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4065 (1986)
244. Е.Б.Бросалина, В.В.Власов, И.В.Кутявин, С.В.Мамаев, А.Г.Плетнев. *Биорг. химия*, **12**, 240 (1986)
245. C.Helene. *Curr. Opinion Biotechnol.*, **4**, 29 (1993)
246. O.S.Fedorova, D.G.Knorre, L.M.Podust, V.F.Zarytova. *FEBS Lett.*, **228**, 273 (1988)
247. T.J.Povsic, S.A.Strobel, P.B.Dervan. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5941 (1992)
248. M.Takasugi, A.Guendouz, M.Chassignol, J.L.Decout, J.Lhomme, N.T.Thuong, C.Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5602 (1991)
249. S.A.Strobel, P.B.Dervan. *Science*, **249**, 73 (1990)
250. J.-C.Francois, T.Saison-Behmoaras, C.Barbier, M.Chassignol, N.T.Thuong, C.Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9702 (1989)
251. Д.С.Сергеев, Т.С.Годовикова, В.Ф.Зарытова. *Биорг. химия*, **21**, 188 (1995)
252. S.Arnott, E.Selsing. *J. Mol. Biol.*, **88**, 509 (1974)
253. D.S.Pilch, C.Levenson, R.H.Shafer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1942 (1990)
254. L.A.Basile, J.K.Barton. In *Metal Ions in Biological System. V.25*. (Eds H.Sigel, A.Sigel). Marcel Dekker, New York, 1989. P.31
255. P.Hertzberg, P.B.Dervan. *Biochemistry*, **23**, 3934 (1984)
256. R.B. van Atta, J.Bernadou, B.Meunier, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **29**, 4783 (1990)
257. N.Murugesan, G.M.Ehrenfeld, S.M.Hecht. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8600 (1982)
258. N.Murugesan, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 493 (1985)
259. W.J.Caspary, C.Niziak, D.A.Lanzo, R.Friedman, N.R.Bachur. *Mol. Pharmacol.*, **16**, 256 (1979)
260. G.R.Buettner, P.L.Moseley. *Biochemistry*, **31**, 9784 (1992)
261. L.F.Povirk. *Biochemistry*, **18**, 3989 (1979)
262. O.I.Aruoma, B.Halliwell, E.Gajewski, M.Dizdaroglu. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20509 (1989)
263. M.Dizdaroglu, O.I.Aruoma, B.Halliwell. *Biochemistry*, **29**, 8447 (1990)
264. Д.С.Сергеев, Т.С.Годовикова, В.Ф.Зарытова. *Биорг. химия*, **22**, 55 (1996)
265. H.Umezawa. In *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. (Ed. S.M.Hecht). Springer-Verlag, New York, 1979. P.15
266. K.Ueda, S.Kobayashi, H.Sakai, T.Komano. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5804 (1985)
267. H.Sugiyama, T.Sera, Y.Dannoue, R.Marumoto, I.Saito. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2290 (1991)

INTERACTION OF BLEOMYCIN AND THEIR OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES WITH NUCLEIC ACIDS

D.S.Sergeyev, V.F.Zarytova

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
8, Prosp. Lavrent'va, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383-2)35-1665*

Interaction of antitumor glycopeptide antibiotic bleomycin with nucleic acids are examined. Equilibrium binding constant data obtained various physico-chemical methods are collected and compared. Contributions of N- and C-terminal domains of glycopeptide molecule to binding with DNA and sequence-specificity of DNA cleavage are discussed. The data of the recently created compounds — bleomycin-oligonucleotide conjugates are given. This conjugates possess simultaneously DNA-cleaving activity of antibiotic (in catalytic manner also) and high selectivity to chosen nucleotide sequence. Bibliography — 267 references.

Received 28th August 1995