

Received: 2005.03.20
Accepted: 2005.05.20
Published: 2005.06.16

Aktynomycyna D i mechanizmy jej działania

Actinomycin D and its mechanisms of action

Marcin Koba¹, Jerzy Konopa²

¹ Katedra i Zakład Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Katedra Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej

Streszczenie

Aktynomycyna D jest znanym antybiotykiem z grupy aktynomycyn, wykazującym dużą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową. W 1954 r. została wprowadzona do leczenia klinicznego jako lek przeciwnowotworowy, okazała się efektywnym chemioterapeutycznym w leczeniu wielu rodzajów nowotworów. Stosowana jest również szeroko jako użyteczne narzędzie w biochemii i biologii molekularnej. Do tej pory – według internetowej bazy bibliograficznej MEDLINE – ukazało się ponad 3300 publikacji dotyczących aktynomycyn, głównie aktynomycyny D, a niniejsza praca jest przeglądem informacji dotyczących poglądów na temat mechanizmów działania tego związku. W literaturze zaproponowano kilka mechanizmów działania aktynomycyny D odpowiedzialnych za jej dużą aktywność cytotoksyczną i przeciwnowotworową, związanych z funkcjonowaniem DNA i prowadzących do zahamowania syntezy RNA, a w konsekwencji do zablokowania syntezy białek. Dwa główne proponowane mechanizmy działania aktynomycyny D to interkalacja związku do DNA: pierścień fenoksazonowy związku układa się między pary zasad w DNA o sekwencji GpC, a pierścienie laktonowe polipeptydów zajmują pozycję w małym rowku helisy DNA. Drugim mechanizmem jest blokowanie przez aktynomycynę D kompleksów rozszczepialnych topoiizomerazy I i II z DNA na zasadzie wnikania leku w strukturę DNA w miejscu przyłączenia się topoiizomerazy. Ponadto, powolna dysocjacja aktynomycyny D z kompleksów z DNA, jej fotodynamiczne działanie i tworzenie wolnych rodników, a także inne działania biochemiczne aktynomycyny D mogą być, jak się sugeruje, ważnymi czynnikami decydującymi o aktywności biologicznej tego związku. W literaturze nie ma przekonujących dowodów, które jednoznacznie wskazywałyby na jeden z przedstawionych mechanizmów działania, jako główny mechanizm odpowiedzialny za aktywność biologiczną aktynomycyny D.

Słowa kluczowe:

aktynomycyna D • mechanizm działania • oddziaływanie z DNA • interkalacja • aktywność biologiczna

Summary

Actinomycin D is a well-known antibiotic of the actinomycin group that exhibits high antibacterial and antitumor activity. Actinomycin D has been widely used in clinical practice since 1954 as an anticancer drug for treating many tumors and it is also a useful tool in biochemistry and molecular biology. According to the Internet bibliographic database – MEDLINE, actinomycins, and mainly actinomycin D, have been the subject of about 3300 science papers so far, and this paper is a review of the information concerning the mechanisms of action of actinomycin D. There are several mechanisms of its action that are responsible for its cytotoxic and antitumor action, these being associated with DNA functionality, leading to RNA and, consequently, protein synthesis inhibition. The two main mechanisms are intercalation to DNA and the stabilization of cleavable complexes of topoisomerases I and II with DNA, in which a phenoxazone ring localizes between GpC base pair sequence in DNA and polypeptide lactones rings occupy a position in



the minor groove of the DNA helix or the drug penetrates to a place in the DNA structure where topoisomerase binds with DNA, respectively. Moreover, the slow dissociation of actinomycin D from DNA complexes, its photodynamic activity and free radical formation, as well as other biochemical effects of activity of actinomycin D may be, as suggested, important factors that influence the biological activity of this drug. In the literature not enough convincing evidence has been proposed that could indicate one particular mechanism of action as responsible for the biological activity of actinomycin D.

Key words: actinomycin D • mechanism of action • interaction with DNA • intercalation • biological activity

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7675.pdf

Word count: 4015

Tables: –

Figures: 1

References: 100

Adres autora: dr Marcin Koba, Katedra i Zakład Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Jagiellońska 13, 85-067 Bydgoszcz; e-mail: kobamar@wp.pl

1. WPROWADZENIE

Aktywność D jako znany antybiotyk i związek przeciwnowotworowy jest od wielu dziesięcioleci przedmiotem zainteresowań wielu badaczy z dziedziny biochemii i medycyny. Dotąd, według internetowej bazy bibliograficznej MEDLINE, ukazało się ponad 3300 publikacji z danymi o aktywnościach, a w szczególności aktywności D. Jednakże, ostatnie prace przeglądowe dotyczące aktywności D ukazały się w latach 70 ub.w., stąd zebranie i podsumowanie informacji na temat mechanizmów działania tego antybiotyku jest uzasadnione.

Cząsteczka aktywności D (ryc. 1) odkryta została przez Waksmana i Woodruffa w 1940 r. w kulturach *Actinomyces antibioticus*. Składa się z dwóch identycznych cyklicznych łańcuchów pięciopiętydowych α i β związanych z pierścieniem fenoksazonowym, a łańcuch polipeptydowy tworzą kolejno następujące aminokwasy: L-treonina (Thr), D-walina (D-Val), L-prolina (Pro), sarkozyna (Sar), L-metylowalina (MeVal). Grupa hydroksylowa L-treoniny bierze udział w wiązaniu estrowym z karboksylową grupą L-metylowaliny tworząc pierścień laktonowy [33,52].

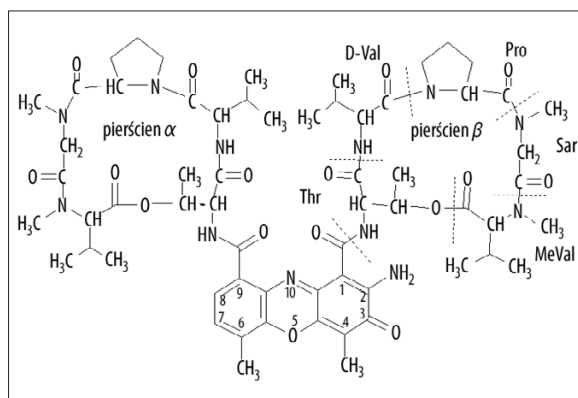
Trójwymiarowa struktura cząsteczki aktywności D opisana została bardzo szczegółowo przez Lacknera [47] i innych badaczy [30,72]. Znalaziono trzy niezależne struktury aktywności D, których geometria jest prawie identyczna, a nieznaczne różnice wynikają z możliwości niewielkich zmian konformacyjnych łańcuchów peptydowych w obrębie wiązania łączącego je z chromoforem, a to ma wpływ na niewielkie zmiany w długości wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Łańcuch peptydowy α cząsteczki aktywności D leży powyżej, a łańcuch β poniżej płaszczyzny pierścienia fenoksazonu. Konformacja wiązań peptydowych pomiędzy kolejnymi aminokwasami jest następująca: *trans* pomiędzy L-treoniną i D-waliną, *cis* pomiędzy D-waliną i L-proliną, *cis* pomiędzy L-proliną i sarkozyną oraz

trans pomiędzy sarkozyną i L-metylowaliną. Struktura aktywności D jest stabilizowana przez dwa silne wiązania wodorowe o długościach około 3 Å, łączące grupę NH reszty D-waliny jednego z pierścieni peptydowych z karbonylowym tlenem D-waliny drugiego z pierścieni peptydowych [30,38,47,72,79]. Gdyby wszystkie wiązania peptydowe w łańcuchach peptydowych aktywności D były w konformacji *trans*, tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych byłoby niemożliwe [51]. Żadne inne wiązania wodorowe nie stabilizują struktury aktywności D, gdyż w resztach wszystkich innych aminokwasów grupy aminowe są metylowane lub wchodzą w skład pierścienia iminokwasu proliny.

2. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE AKTYWNOŚCI D

Aktywność D okazała się efektywnym chemioterapeutycznym i w roku 1954 wprowadzono ją do leczenia jako lek przeciwnowotworowy, stosowany zarówno oddzielnie, jak i z winkristyną, antracyklinami czy w połączeniu z radioterapią [65]. Skuteczny w leczeniu raka Wilmsa, mięsaka Ewinga, neuroblastomy oraz nowotworów trofoblastycznych, przede wszystkim u dzieci [23,33]. Aktywność D stosowana jest również jako narzędzie w badaniu wielu procesów komórkowych, np. biosyntezy makromolekuł komórkowych, transporcie RNA czy replikacji wirusów [33,36,52,99]. Ponadto, pochodna aktywności D, 7-aminoaktywność D, ze względu na swoje silne właściwości fluorescencyjne, znalazła szerokie zastosowanie w badaniach cytochemicznych i cytometrycznych [64,73,82].

Aktywność D przenika szybko przez błony komórkowe na zasadzie biernej dyfuzji i gromadzi się selektywnie, przede wszystkim w jądrach komórek ssaków w około 91%, podczas gdy w cytoplazmie w 5,5%, w mitochondriach w 2,3%, a w mikrosomach w 1,2%. Ponadto, aktywność D wywołuje znaczne zmiany w jądrze i chromatynie, tj. kondensację jądra, segregację chromatyny i rozdzielenie



Ryc. 1. Wzór aktynomycyny D

nie jej komponentów oraz wykazuje pewną tendencję do koncentracji w końcach chromosomów i w pobliżu centromeru [33,35,52,98].

Aktynomycyna D wywołuje, zależne od czasu inkubacji i dawki związku, zmiany w cyklu komórkowym, zmniejszając szybkość przechodzenia komórek przez fazę S i zatrzymanie w fazie G₂ cyklu komórkowego [68]. Komórki w fazie S i G₂ są najbardziej wrażliwe, nawet na krótkie działanie aktynomycyny D, co może być związane z wpływem tego związku na działanie topoiizomazy II [97].

Aktynomycyna D jest induktorem apoptozy [32,44,59] wywołując ten proces w komórkach prawidłowych i nowotworowych, a także w komórkach, które rzadko ulegają apoptozie [70]. Przypuszcza się, że molekularny mechanizm indukcji apoptozy przez aktynomycynę D, jest zależny od ścieżki prowadzącej do śmierci komórki, związanej z aktywnością białka powierzchniowego FAS [31] lub jest związany z aktywacją ścieżki apoptotycznej JNK/SAPK i zwiększoną ekspresją białka Bax [44]. W komórkach odpowiedzi immunologicznej indukcja apoptozy przez aktynomycynę D, jest prawdopodobnie związana z ekspresją antygeny powierzchniowego CD69 [56]. Dodatkowo, obecność wewnątrzkomórkowego ATP jest niezbędna do indukcji apoptozy przez aktynomycynę D [20].

Nie ma korelacji pomiędzy cytotoksycznym działaniem aktynomycyny D, a stężeniem leku w tkance. Cytotoksyczność zależy bardziej od przedłużonego zatrzymania antybiotyku w komórce, czyli od zdolności komórki do akumulowania i przetrzymywania leku, a transport do komórki jest różny dla różnych rodzajów nowotworów i typów komórek. Komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na działanie aktynomycyny D od komórek prawidłowych, a nowotwory wysiękowe są lepiej hamowane przez aktynomycynę D niż nowotwory lite, chociaż niektóre białaczki są hamowane tylko w niewielkim stopniu, a wiele nowotworów jest niewrażliwych na działanie aktynomycyny D [52,87].

Wiele linii komórkowych opornych na działanie aktynomycyny D, wykazuje również oporność krzyżową i/lub oporność wielolekową na związki, takie jak mitramycyna, winblastyna, winkrystyna, daunomycyna, mitomycyna C czy adriamycyna, bleomycyna, etopozyd i VM 26, ale nie wykazuje oporności krzyżowej na cisplatinę i metotretksat. Jest to związane z transportem przez błonę komórko-

wą i funkcjonowaniem oraz regulacją odpowiedzialnych za ten transport glikoprotein, a przede wszystkim glikoproteiny P, co w przypadku komórek opornych wiąże się ze zwiększonym wypompowywaniem aktynomycyny D i innych związków z komórek [6,24,63].

3. MECHANIZMY DZIAŁANIA AKTYNOMYCYNY D

3.1. Niekowalencyjne wiązanie aktynomycyny D z DNA

Aktynomycyna D wiąże się z podwójną helisą DNA zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, tworząc odwracalne kompleksy. Z jednoniciowym DNA [37,89] lub RNA, z dwuniciowym RNA oraz z hybrydami DNA-RNA, aktynomycyna D nie wiąże się wcale lub bardzo słabo [79,83,84], a swoistość wiązania aktynomycyny D do podwójnej helisy DNA jest prawdopodobnie spowodowana wymogami sterycznymi łańcuchów peptydowych antybiotyku, rozpoznających prawoskrętną postać B DNA [79]. Aktynomycyna D może się również wiązać z lewoskrętną postacią Z DNA, ale konformacja DNA w miejscu wiązania AMD ulega konwersji do prawoskrętnej [34,48,92]. Ponadto, aktynomycyna D hamuje rozwój DNA wirusów, w przeciwieństwie do RNA wirusów [33]. Na tej podstawie uznano, że celem molekularnym cytotoksycznego działania tego związku w komórkach jest dwuniciowy DNA.

3.1.1 Miejsce wiązania i struktura kompleksu aktynomycyny D z DNA

W 1972 roku Sobell i Jain, wykorzystując metody krystalograficzne, określili strukturę kompleksu jednej cząsteczki aktynomycyny D z dwoma cząsteczkami deoksyguanozyny i dwunastoma cząsteczkami wody, co pozwoliło ustalić, że aktynomycyna D interkaluje pomiędzy dwie zasady guaniny, podczas gdy obie podjednostki pięciopiętydowe mogą się układać w mniejszym rowku helisy DNA [38].

W kompleksie tym deoksyguanozyna wiąże się silnie z aktynomycyną D w stosunku 2:1, a pierścienie fenoksazonowy antybiotyku jest „wciśnięty” pomiędzy dwa pierścienie deoksyguanozyny, podczas gdy łańcuchy polipeptydowe znajdują się względem siebie po przeciwnych stronach chromoforu. L-treonina, znajdująca się w każdym z łańcuchów polipeptydowych, tworzy silne wiązania wodorowe (2,80 Å, 2,82 Å) pomiędzy jej karbonylowym atomem tlenu, a grupą 2-amino guaniny leżącej naprzeciwko łańcuchów polipeptydowych. Tworzone są również słabsze wiązania wodorowe (3,15 Å, 3,25 Å), łączące azot w pozycji N₃ pierścienia guaniny z grupą NH, należącą do tej samej co poprzednio reszty L-treoniny. Istnieje ponadto wiele korzystnych oddziaływań typu Van der Waalsa, gdyż reszty cukrowe deoksyguanozyny znajdują się w sterycznej bliskości grup izopropylowych reszt L-metylowaliny. Charakterystyczną właściwością tego kompleksu jest jego niemal całkowita symetryczność. Podwójna oś symetrii biegnie wzdłuż linii łączącej centralne atomy O i N w pierścieniu fenoksazonu, a zatem symetria aktynomycyny D pokrywa się z symetrią helisy DNA [38,79].

Sobell i Jain, na podstawie struktury kompleksu aktynomycyny D z deoksyguanozyną [38] i w oparciu o obliczenia komputerowe, zaproponowali szczegółowy model wiązania aktynomycyny D z helikalnym DNA [81]. W modelu

tym, heksanukleotydem o sekwencji ATGCAT, który jest autokomplementarny i przybiera strukturę podwójnej helisy DNA, tworzy z cząsteczką aktywność D przestrzenną konformację, tą samą z otrzymaną dla kompleksu aktywność D-deoksyguanozyna. Obie reszty cukrowe, deoksyguanozyna i deoksytydyna na tej samej nici DNA ulegają rotacji, zmieniając kąt skręcenia helisy postaci B DNA z 36° do około 15°, tworząc w ten sposób wystarczającą ilość miejsca do interkalacji chromoforu aktywność D pomiędzy pary zasad DNA. Wyjaśnia to, dlaczego aktywność D wiąże się najlepiej do polinukleotydu poly(dG-C)_n, zawierającego sekwencję GpC. Łańcuchy peptydowe aktywność D leżą w małym rowku helisy DNA zajmując długość 6 par zasad i oddziałują z nią, podobnie jak w kompleksie aktywność D-deoksyguanozyna, poprzez cztery wiązania wodorowe i liczne oddziaływania Van der Waalsa. Długość wiązań wodorowych różni się jednak nieznacznie, gdyż łańcuchy peptydowe, ulegają niewielkim zmianom konformacyjnym, które nie były obserwowane w kompleksie aktywność D-deoksyguanozyna. Ponadto, grupa aminowa w pozycji C₂ chromoforu aktywność D może tworzyć, poprzez mostek wodny, wiązanie wodorowe z tlenem grupy fosforanowej łańcucha cukrowo-fosforanowego DNA. Dodatkowo, możliwe jest tworzenie wiązania wodorowego tej samej grupy aminowej z tlenem pierścienia pentozowego deoksytydyny.

Interkalacyjny model wiązania aktywność D z DNA zaproponowany przez Sobella i Jaina, potwierdziły wyniki licznych badań naukowych [19,100], a wśród nich szczególnie badania z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego: Patela [62] nad strukturą kompleksu aktywność D z nukleotydami w roztworach wodnych, Krugha i wsp. [18,46] nad kompleksami aktywność D z różnymi nukleotydami oraz wyniki badań rentgenograficznych [84] kompleksu aktywność D z heksanukleotydem d(ATGCAT), a przede wszystkim uzyskanie przez Tukasagawę [40] struktury krystalograficznej kompleksu aktywność D z oktamerem d(GAAGCTTC).

Wyniki innych badań krystalograficznych struktury kompleksu dwóch cząsteczek deoksydinuklotydu d(GpC) z jedną cząsteczką aktywność D przeprowadzonych przez Tukasagawę i wsp. [83] wykazały, że w kompleksie aktywność D-d(GpC), cząsteczka d(GpC) nie przybiera konformacji podwójnej helisy DNA, ale konformację otwartą na zewnątrz, tworząc z DNA tzw. kompleks „pseudointerkalacyjny”. Niemniej, podobnie jak w modelu Sobella i Jaina [81], guanina oddziałuje z pierścieniami peptydowymi aktywność D poprzez te same, co w kompleksie aktywność D-deoksyguanozyna wiązania wodorowe. Cytosyna jednak nie bierze udziału w tworzeniu jakichkolwiek wiązań wodorowych z cząsteczką aktywność D. Dane te sugerowały, że aktywność D może oddziaływać z guaninami należącymi do dwóch różnych dwuniciowych łańcuchów DNA, tworząc tzw. niekwalencyjne wiązania sieciujące DNA, co potwierdziły badania nad zmianą topologii DNA pod wpływem aktywność D [71].

Jak wiadomo, aktywność D wiąże się preferencyjnie i najsilniej z DNA w miejscach o sekwencji 5'-GpC-3'. Może się ona jednak wiązać z DNA również do miejsc o innych sekwencjach DNA, zawierających guaninę lub niezawierających jej wcale, zazwyczaj z mniejszym powi-

nowactwem i wydajnością [1,94,96]. Jest to zgodne z przypuszczeniami Foxa i Waringa [28,29], którzy wysunęli tzw. „shuffling hypothesis”, czyli hipotezę zmiany miejsc wiązania przez aktywność D na DNA. Według tej hipotezy, aktywność D wiąże się początkowo z nieswoistą sekwencją DNA, a później zmienia swoje miejsce wiązania wzdłuż nici DNA, aż zlokalizuje preferencyjne miejsce wiązania o sekwencji GpC. Sugerują to również inne wyniki badań [2], według których w pierwszym etapie antybiotyk rozpoznaje geometrię małego rowka, a następnie przemieszcza się wzdłuż helisy, aż do miejsca o sekwencji GpC, gdzie następuje jego interkalacja i najsilniejsze wiązanie z DNA. Jeszcze inne badania [41], opisują trzy różne sposoby wiązania aktywność D do tej samej d(GAAGCTTC) sekwencji DNA. Sugeruje to, że zarówno DNA, jak i łańcuchy peptydowe mogą przyjmować korzystną dla interkalacji związków konformację. Jak wiadomo, helisa DNA ulegać może różnego rodzaju rozpleceniom, co powoduje zmiany w geometrii rozpoznawanego przez aktywność D, małego rowka. Jeżeli związek interkaluje do DNA, w którym mały rowek jest głęboki i wąski, tak jak w postaci B DNA, łańcuchy peptydowe aktywność D nie zmieniają swojej konformacji, a pierścień fenokszonowy oddziałuje głównie z guaniną. Jeżeli natomiast mały rowek jest płytki i szeroki, co jest charakterystyczne dla DNA w postaci A, pierścień peptydowy α aktywność D dopasowując się do jego geometrii, ulega zmianom konformacyjnym w wyniku rotacji wiązania N-C_α treoniny, a pierścień fenokszonowy oddziałuje nie tylko z guaniną, ale i także z cytozyną.

Dalsze badania zmierzały w kierunku jeszcze lepszego zrozumienia sposobu oddziaływania aktywność D z DNA i jego zależności od sekwencji nukleotydów i konformacji przestrzennej DNA. Badania [50] z wykorzystaniem 7-azydoaktywność D, związku który, w wyniku fotolizy może tworzyć kowalencyjne wiązanie z DNA potwierdziły, że sekwencja GC jest najbardziej reaktywnym miejscem w DNA dla oddziaływania z aktywność D, a sąsiadujące z miejscem GC nukleotydy mają znaczący wpływ na siłę wiązania aktywność D. Sekwencja 5'-(pirymidyna)GC(puryna)-3', a szczególnie miejsce TGCA jest najbardziej reaktywne, podczas gdy do sekwencji GGCC powinowactwo aktywność D jest bardzo małe. Duże powinowactwo aktywność D zaobserwowano również do sekwencji TGGGT, która jak się przypuszcza odgrywa znaczącą rolę w telomerach chromosomów.

Metodą NMR zbadano również strukturę kompleksu aktywność D z oligomerem DNA o sekwencji d(TCGCGTTTTTCGCGA) [8], który przyjmuje strukturę spinki do włosów (hairpin) i jest ważnym elementem drugorzędowej struktury kwasów nukleinowych oraz miejscem rozpoznania dla różnych białek. Jak się spodziewano, aktywność D interkaluje w miejscu o sekwencji GpC, ale tworzy dwa kompleksy powstające w różnych ilościach.

Inne badania wiązania aktywność D z dupleksem d(AGCGCTT) łączone NMR i modelowanie molekularne [17] wykazały, że związek ten interkaluje do graniczących ze sobą miejsc wiązania o sekwencji GC. Wiązanie takie wywołuje wyraźny skręt helisy oraz otwarcie i poszerzenie małego rowka, niezbędne do pomieszczenia łańcuchów peptydowych obu cząsteczek aktywność D, gdzie

pierścienie α skierowane są do środka helisy, a pierścienie β w kierunku końca helisy. Wyniki innych badań [78], wykazały również, że aktynomycyna D często wiąże się do granicznych ze sobą miejsc wiązania, co wskazuje, że w warunkach fizjologicznych aktynomycyna D preferuje miejsca wiązania położone blisko siebie.

Znaleziono również, oligomeryczny dupleks o sekwencji $[d(CGTCGACG)]_2$ wiążący silnie aktynomycynę D w stosunku 1:2 i ze stałą wiązania rzędu 10^7 $[M^{-1}]$, z preferencją nie do klasycznej sekwencji 5'-GpC-3', ale do miejsca 3'-dG [14]. Wskazuje to, że aktynomycyna D może również wiązać się z DNA w sposób inny niż klasyczna interkalacja pomiędzy pary GC, a wyniki badań [15,16,76] nad wiązaniem aktynomycyny D do oligomerów pozbawionych sekwencji GpC oraz badania krystalograficzne kompleksu aktynomycyny D z dekamerem CGATCGATCG [67], potwierdziły wpływ sąsiednich zasad w miejscu 3'-dG na charakter i siłę wiązania aktynomycyny D do DNA.

Inne badania [13,90,91] wykazały, że aktynomycyna D stabilizuje również jednoniciowe DNA (ssDNA) przyjmujące drugorzędową strukturę spinki do włosów, a stabilizacja ta może być również jednym z ważnych czynników odpowiedzialnych za hamowanie transkrypcji przez ten związek [66]. Stabilizacja ssDNA przez aktynomycynę D, jak wykazały badania [89], zależy nie tylko od sekwencji nukleotydowej, ale również od długości jednoniciowego DNA, która przy długości krótszej niż 14 nukleotydów wiąże cząsteczkę aktynomycyny D najmocniej, ze stałą wiązania większą od 10^4 $[M^{-1}]$. Było to zgodne z wynikami Wadkinsa i wsp. [88], które również potwierdziły, że sekwencja TAGT stanowi najbardziej uprzywilejowane, ale nie jedyne miejsce wiązania aktynomycyny D do ssDNA. Wyniki te dostarczyły ponadto mocnych dowodów na istnienie częściowej interkalacji aktynomycyny D pomiędzy pary A i G, z możliwością tworzenia dwóch orientacji przestrzennych takiego kompleksu. Mimo że łańcuchy peptydowe aktynomycyny D są identyczne, to pierścień fenoksazonowy nie jest symetryczny i wymusza dwie konformacje, w której albo część chinoidowa albo część benzenoidowa chromoforu leży nad sześcioczołonowym pierścieniem adeniny. Tworzy się wtedy może pięć wiązań wodorowych. Odpowiednio trzy wiązania pomiędzy O i grupą NH treoniny pierścienia α a grupami N1H/N2H i tlenem O6 guaniny oraz dwa wiązania pomiędzy O i grupą NH treoniny pierścienia β , a grupą N6H i azotem N1 adeniny.

Znacząca wydaje się również rola hydratacji helisy DNA, która ma wpływ na zmiany konformacji helisy, niezbędne do wiązania cząsteczki aktynomycyny D. Jak się wydaje, istnieje zależność pomiędzy liczbą cząsteczek wody, a miejscem wiązania podczas tworzenia kompleksu aktynomycyna D-DNA [69].

3.2. Kinetyka dysocjacji aktynomycyny D z kompleksów z DNA

Znaczenie kinetyki asocjacji-dysocjacji aktynomycyny D z kompleksów z DNA dla aktywności biologicznej tego związku, było po raz pierwszy badane przez Mullera i Crothersa [57]. Wykazali oni, że kinetyka wiązania aktynomycyny D z DNA jest procesem wieloetapowym, a dysocjację kompleksu aktynomycyny D z DNA opisują trzy

stałe czasowe (12, 44, 570 s), które mogą odpowiadać trzem różnym sposobom wiązania leku z DNA, zależnym od sekwencji DNA i związanym ze zmianami konformacyjnymi pierścieni peptydowych, potrzebnych do silnego związania cząsteczki aktynomycyny D z DNA. Jeżeli aktynomycyna D jest związana z sekwencją inną niż GC, jeden z pierścieni polipeptydowych leku tworzy kompleks z DNA. Wtedy, zależnie od sekwencji nukleotydów w obrębie miejsca wiążącego, która narzuca konformację przestrzenną DNA i tym samym wymusza konformację przestrzenną cząsteczki aktynomycyny D, czasowa stała dysocjacji wynosi 12 lub 44 s. Kiedy aktynomycyna D jest związana z sekwencją GC, oba pierścienie laktonowe oddziałują z parami GC w DNA, zgodnie z interkalacyjnym modelem wiązania aktynomycyny D z DNA. Czasowa stała dysocjacji kompleksu aktynomycyna D-DNA jest wtedy największa i wynosi 570 s.

Przypuszczenia te potwierdziły badania [7] nad asocjacją aktynomycyny z DNA, według których etapy wiązania aktynomycyny D z DNA opisuje pięć stałych szybkości wiązania. Oddziaływania pierścienia fenoksazonu aktynomycyny D z DNA i wiązanie z parami GC charakteryzują dwie pierwsze stałe szybkości wiązania. Kolejne trzy stałe charakteryzują natomiast etapy oddziaływania łańcuchów peptydowych aktynomycyny D z DNA w procesie formowania kompleksu aktynomycyna D-DNA. Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic w stałych szybkości wiązania pomiędzy wiązaniem aktynomycyny D do liniowego i superskręconego DNA.

Jednakże niektóre wyniki badań poddają w wątpliwość udział zmian konformacyjnych łańcuchów peptydowych aktynomycyny D, obserwowanych w powolnej i wieloetapowej dysocjacji tego antybiotyku z DNA, sugerując raczej znaczenie izomeryzacji *cis-trans* wiązania peptydowego pomiędzy walina, a prolina [54,55]. Inne wskazują na dysocjację aktynomycyny D z DNA jako powolny, ale jednoetapowy proces, związany raczej z sekwencją nukleotydową miejsca wiążącego związek [45]. Wyniki badań kinetyki dysocjacji aktynomycyny D z DNA przeprowadzone *in vitro*, w warunkach aktywnej transkrypcji DNA, gdzie czasowa stała dysocjacji wynosiła 2900 s sugerują, że kompleks aktynomycyna D-DNA może być dodatkowo stabilizowany przez oddziaływanie z polimerazą RNA [95].

Badania kinetyki dysocjacji [25] aktynomycyny D z różnych fragmentów DNA, zawierających dinukleotydy GpC, potwierdziły wpływ sąsiednich nukleotydów w obrębie sekwencji GpC na siłę wiązania tego związku do DNA. Zarówno Chen [11], a także Fletcher i Fox [26] stwierdzili, że sekwencja TGCA stanowi korzystniejsze miejsce wiązania antybiotyku niż sekwencja AGCT, a sekwencja CGCA stanowi korzystniejsze miejsce wiązania aniżeli sekwencja GGCA. Świadczy to o tym, że dla najlepszego wiązania aktynomycyny D, pirymidyna powinna sąsiadować z końcem 5', a puryna z końcem 3' sekwencji GpC, jednakże najsilniejsze wiązanie aktynomycyny D jest obserwowane dla sekwencji TGCA.

Najsilniejsze wiązanie aktynomycyny D zaobserwowano jednak wtedy, kiedy z obu stron sekwencji GpC występuje tymina. Bardzo powolna dysocjacja aktynomycyny D z sekwencji TGCT wskazuje, że występowanie tymi-



ny w okolicach małego rowka DNA, daje możliwość korzystnych oddziaływań z łańcuchami peptydowymi tego związku [49].

Aktywność D może również wiązać się do nukleotydów niezawierających sekwencji dGpC, z porównywalną stałą wiązania [3]. Jednak czas dysocjacji aktywności D z takich oligonukleotydów, np. T(G)_nT, jest o wiele krótszy niż oznaczony dla dysocjacji aktywności D z oligonukleotydów zawierających sekwencję dGpC [2].

Badania nad wiązaniem aktywności D z oligomerami tworzącymi powtarzające się trójnukleotydowe sekwencje CXG, gdzie X może być jedna z czterech zasad wykazują, że heterodupleksy zawierające powtórzenia CAG-CTG najsilniej wiążą się z DNA i najwolniej dysocjują, w porównaniu z heterodupleksami zawierającymi powtórzenia CGG-CCG. Liczba powtarzających się trójnukleotydowych sekwencji, ma również wpływ na siłę wiązania i szybkość dysocjacji aktywności D, co może mieć biologiczne znaczenie w przypadku chorób genetycznych związanych ze wzrostem liczby powtarzających się sekwencji trójnukleotydowych [12].

Szybkość wiązania aktywności D z DNA może zależeć zatem od długości fragmentów DNA, ale jest przede wszystkim odzwierciedleniem ilości dostępnych, preferencyjnych miejsc wiązania związku z DNA [9]. Stała wiązania aktywności D z DNA jest rzędu 10⁶ [M⁻¹], a ilość par nukleotydów związanych z DNA waha się od 0 par zasad przy braku dG w sekwencji DNA do około 6 par zasad przy 50% ilości dG w sekwencji DNA [36].

Powolna dysocjacja aktywności D związanej z DNA może być zatem ważnym czynnikiem decydującym o aktywności biologicznej tego związku, tym bardziej że jest ona kilka rzędów wolniejsza niż dysocjacja innych interkalatorów, takich jak proflawina, etydyna czy daunomycyna [77]. Warto również wspomnieć, że w grupie pochodnych aktywności D obserwowana jest korelacja pomiędzy szybkością dysocjacji związku z DNA, a aktywnością przeciwbakteryjną [55].

3.3. Stabilizacja rozszczepialnych kompleksów topoizomerazy I lub II z DNA przez aktywność D

W komórkach traktowanych aktywnością D od dawna obserwowano powstawanie pęknięć DNA [68]. W warunkach inkubacji aktywności D z DNA *in vitro* takiego efektu nie obserwowano, co wskazywało, że sama interkalacja związku do DNA nie jest odpowiedzialna za powstawanie pęknięć DNA. Dopiero badania Traska i Mullera [86] wyjaśniły, że indukowanie przez aktywność D cięć DNA jest wynikiem stabilizacji rozszczepialnych kompleksów topoizomerazy I z DNA lub, jak pokazały dalsze badania [93], powstałe cięcia DNA mogą być również wynikiem stabilizacji rozszczepialnych kompleksów topoizomerazy II z DNA.

Mechanizm stabilizacji przez aktywność D kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA polega, jak się wydaje, na wiązaniu się związku z DNA, co wywołuje pewne zmiany konformacyjne w helisie DNA i zablokowanie znajdującego się w pobliżu kompleksu topoizomeraza-DNA.

Uniemożliwia to dalsze działanie enzymu i w końcowym efekcie powoduje powstawanie pęknięć DNA, czego daleko idącym skutkiem jest zahamowanie syntezy RNA i DNA oraz proliferacji komórek nowotworowych. W przypadku dużego stężenia związku, bardziej prawdopodobnym wydaje się niemożność wiązania enzymu z miejscem wiązania w DNA, którego konformacja uległa dużym zmianom w wyniku interkalacji związku [19,22,60].

Dla wielu związków interkalujących do DNA wykazano blokowanie reakcji ligacji przeciętych nici DNA w kompleksie rozszczepialnym topoizomerazy I lub topoizomerazy II z DNA. Kompleksy takie, pod wpływem czynników denaturujących, takich jak SDS lub alkalia, mogą ulegać rozbiciu, co powoduje powstawanie pojedynczych lub podwójnych pęknięć DNA związanych odpowiednio z topoizomerazą I lub topoizomerazą II [10,21].

3.4. Hamowanie syntezy RNA i DNA przez aktywność D

Najwcześniejszym biochemicznym następstwem wiązania się aktywności D z DNA jest hamowanie syntezy RNA, zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, co w konsekwencji powoduje zablokowanie syntezy białek. Hamowanie syntezy RNA przez aktywność D jest obserwowane już przy małych stężeniach związku (0,001-0,1 µg/ml). Dotyczy wszystkich jego postaci i zachodzi przede wszystkim na etapie „elongacji” łańcucha RNA, co potwierdziły badania Sobella [80] i badania krystalograficzne [67] kompleksu aktywności D z oligonukleotydem, który imitował miejsce rozpoczęcia „elongacji” transkrypcji. Najbardziej blokowana jest jednak synteza rRNA, co jest związane z interkalacją aktywności D do rDNA bogatego w pary GC, a co za tym idzie zahamowaniem aktywności zależnej od DNA polimerazy RNA [33,36,86,93]. Istnieje ponadto zależność pomiędzy hamowaniem transkrypcji rRNA przez aktywność D a stabilizacją kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza I-DNA, a jak wiadomo przeważająca większość topoizomerazy I jest umiejscowiona w jąderku, w okolicach intensywnie transkrybowanych genów rRNA [86,93]. Jedną cząsteczką aktywności D przypadającą na około 1000 par zasad, powoduje zahamowanie w 50% syntezy RNA [57]. Jednakże, jak pokazują wyniki badań hamowania przez aktywność D wbudowywania urydyny do RNA, aktywność cytotoksyczna tego antybiotyku niekoniecznie musi być związana z hamowaniem syntezy RNA [74]. Aktywność D równie skutecznie blokuje aktywność innych polimeraz, a szczególnie odwrotnej transkryptazy wirusa HIV odpowiedzialnej za transkrypcję tego wirusa [39,66]. Hamowanie przez aktywność D syntezy DNA zachodzi natomiast przy znacznie wyższych stężeniach leku, co wskazuje na inny mechanizm inhibicji niż w przypadku hamowania syntezy RNA [33,36], związany być może z blokowaniem topoizomerazy II [93].

3.5. Tworzenie rodników oraz fotodynamiczne działanie aktywności D

Pojawiły się również dowody fotodynamicznego działania aktywności D. Technika EPR wykryła powstające pod wpływem światła w kompleksach aktywności D-DNA, anionorodnik ponadtenkowy i anionorodnik aktywności D.

D. Ten fotodynamiczny proces jest zapoczątkowany przez kwant energii i przekazanie elektronu z zasady w DNA na wzbudzoną pod wpływem światła cząsteczkę aktynomycyny D. Powstaje anionorodnik aktynomycyny D, który – jak wynika z badań nad enzymatyczną [27,75] i chemiczną [58,75] redukcją aktynomycyny D – jest następstwem redukcji pierścienia fenoksazonowego. Anionorodnik aktynomycyny D, może być następnie przechwycony przez tlen cząsteczkowy O₂, prowadząc do utworzenia anionorodnika ponadtlenkowego. Powstały wcześniej, w wyniku przekazania elektronu na rodnik aktynomycyny D, kationorodnik zasady azotowej w DNA może prowadzić do uszkodzeń DNA, a przede wszystkim do powstawania cięć DNA. Może się to wiązać z przyszłym zastosowaniem tego związku w fotodynamicznej terapii i uszkodzaniu DNA w kontrolowany sposób [61].

PIŚMIENICTWO

- [1] Allen F.S., Jones M.B., Hollstein U.: First-neighbor specificities of actinomycin-DNA binding by circular dichroism. *Biophys. J.*, 1977; 20: 69–78
- [2] Bailey S.A., Graves D.E., Rill R.: Binding of actinomycin D to T(G)_nT motif of double-stranded DNA: determination of the guanine requirement in nonclassical, non-GpC binding sites. *Biochemistry*, 1994; 33: 11493–11500
- [3] Bailey S.A., Graves D.E., Rill R., Marsch G.: Influence of DNA base sequence on the binding energetics of actinomycin D. *Biochemistry*, 1993; 32: 5881–5887
- [4] Bailly C., Graves D.E., Ridge G., Waring M.J.: Use of photoactive derivative of actinomycin to investigate shuffling between bonding sites to DNA. *Biochemistry*, 1994; 33: 8736–8745
- [5] Betzel C., Rachev R., Dolashka P., Genov N.: Actinomycins as proteinase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993; 1161: 47–51
- [6] Biedler J.L., Riehm H.: Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 1970; 30: 1174–1184
- [7] Bittman R., Blau L.: Stopped-flow kinetic studies of actinomycin binding to DNAs. *Biochemistry*, 1975; 14: 2138–2145
- [8] Brown D.R., Kurz M., Kearns D.R., Hsu V.L.: Formation of multiple complexes between actinomycin D and a DNA hairpin: structural characterization by multinuclear NMR. *Biochemistry*, 1994; 33: 651–664
- [9] Brown S.C., Shafer R.H.: Kinetic studies of actinomycin D binding to mono-, oligo- and polynucleotides. *Biochemistry*, 1987; 26: 277–282
- [10] Chen A.Y., Liu L.F.: DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1994; 34: 191–218
- [11] Chen F.M.: Observation of anomalously slow association kinetics in the binding of actinomycin D to d(CATGGCCATG). *Biochemistry*, 1990; 29: 7684–7690
- [12] Chen F.M.: Binding of actinomycin D to DNA oligomers of CXG trinucleotide repeats. *Biochemistry*, 1998; 37: 3955–3964
- [13] Chen F.M., Jones C.M., Johnson Q.L.: Dissociation kinetics of actinomycin D from oligonucleotides with hairpin motifs. *Biochemistry*, 1993; 32: 5554–5559
- [14] Chen F.M., Liu C.: Is the strong actinomycin D binding of d(5'CGTC-GACG3') the consequence of end-stacking? *Biochemistry*, 1996; 35: 7283–7291
- [15] Chen F.M., Sha F.: Actinomycin D binds strongly to d(TGTCATTG), a single-stranded DNA devoid of GpC sites. *Biochemistry*, 2001; 40: 5218–5225
- [16] Chen F.M., Sha F.: Actinomycin D binds to d(TGTCATG) with 2:1 drug to duplex stoichiometry. *Biochemistry*, 2002; 41: 5043–5049
- [17] Chen H., Liu X., Patel D.J.: DNA bending and unwinding associated with actinomycin D antibiotics bound to partially overlapping sites on DNA. *J. Mol. Biol.*, 1996; 258: 457–479
- [18] Chiao Y.C., Krugh T.R.: Actinomycin D complexes with oligonucleotides as models for the binding of the drug to DNA. Paramagnetic induced relaxation experiments on drug-nucleic acid complexes. *Biochemistry*, 1977; 16: 747–755
- [19] Chinsky L., Turpin P.Y., Duquesne M.: Resonance Raman study of actinomycin D interaction with DNA and its models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975; 65: 1440–1446
- [20] Chou C.C., Lam C.Y., Yung B.Y.: Intracellular ATP is required for actinomycin D-induced apoptotic cell death in HeLa cells. *Cancer Lett.*, 1995; 96: 181–187
- [21] Corbett A.H., Osheroff N.: When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993; 6: 585–597
- [22] D'Arpa P., Liu L.F.: Topoisomerase - targeting antitumor drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 989: 163–177
- [23] Davidson A., Pritchard J.: Actinomycin D, hepatic toxicity and Wilms' tumour – a mystery explained? *Eur. J. Cancer.*, 1998; 34: 1145–1147
- [24] Diddens H., Gekeler V., Neumann M., Niethammer D.: Characterization of actinomycin-D-resistant CHO cell lines exhibiting a multidrug-resistance phenotype and amplified DNA sequences. *Int. J. Cancer*, 1987; 40: 635–642
- [25] Fletcher M.C., Fox K.R.: Visualizing the kinetics of dissociation of actinomycin from individual sites in mixed sequence DNA by DNase I footprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1993; 21: 1339–1344
- [26] Fletcher M.C., Fox K.R.: Dissociation kinetics of actinomycin D from individual GpC sites in DNA. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 237: 164–170
- [27] Flitter W.D., Mason R.P.: The enzymatic reduction of actinomycin D to a free radical species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1988; 267: 632–639
- [28] Fox K.R., Waring M.J.: DNA structural variations produced by actinomycin and distamycin as revealed by DNAase I footprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1984; 12: 9271–9285
- [29] Fox K.R., Waring M.J.: Footprinting reveals that nogalamycin and actinomycin shuffle between DNA binding sites. *Nucleic Acids Res.*, 1986; 14: 2001–2014
- [30] Ginell S., Lessinger L., Berman H.M.: The crystal and molecular structure of the anticancer drug actinomycin D – some explanations for its unusual properties. *Biopolymers*, 1988; 27: 843–864
- [31] Glazyrin A.L., Chinni S., Alhasan S., Adsay V.N., Vaitkevicius V.K., Sarkar F.H.: Molecular mechanism(s) of actinomycin-D induced sensitization of pancreatic cancer cells to CD95 mediated apoptosis. *Int. J. Oncol.*, 2002; 20: 201–205
- [32] Goebel S., Luder C.G.K., Gross U.: Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1999; 187: 221–226
- [33] Goldberg I.H.: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Part II, Springer-Verlag, Berlin, 1975: 582–592
- [34] Gupta G., Dhingra M.M., Sarma R.H.: Left-handed intercalated DNA double helix: rendezvous of ethidium and actinomycin D in the Z-helical conformation space. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1983; 1: 97–113
- [35] Hendrix M.J., Wagner H.N.Jr., Thomson S.P., Brothman A.R., Lindell T.J.: Immunohistochemical localization of actinomycin D in human melanoma tumor cells. *Anticancer Res.*, 1984; 4: 97–102
- [36] Hollstein U.: Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chem. Rev.*, 1974; 74: 625–652



- [37] Hsieh Y.L., Li Y.T., Henion J.D., Ganem B.: Studies of non-covalent interactions of actinomycin D with single-stranded oligodeoxynucleotides by ion spray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, 1994; 23: 272–276
- [38] Jain S.C., Sobell H.M.: Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. I. Refinement and further structural details of the actinomycin-deoxyguanosine crystalline complex. *J. Mol. Biol.*, 1972; 68: 1–20
- [39] Jeeninga R.E., Huthoff H.T., Gulyaev A.P., Berkhout B.: The mechanism of actinomycin D-mediated inhibition HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.*, 1998; 26: 5472–5479
- [40] Kamitori S., Takusagawa F.: Crystal structure of 2:1 complex between d(GAAGCTTC) and the anticancer drug of actinomycin D. *J. Mol. Biol.*, 1992; 225: 445–456
- [41] Kamitori S., Takusagawa F.: Multiple binding modes of anticancer drug actinomycin D: X-ray, molecular modeling, and spectroscopic studies of d(GAAGCTTC)_n-actinomycin D complexes and its host DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994; 116: 4154–4165
- [42] Kapp L.N., Okada S.: Actinomycin D induction of acid phosphatase in synchronized L5178Y mouse leukemia cells. *Exp. Cell Res.*, 1972; 72: 473–479
- [43] Killewich L., Schutz G., Freigelson P.: Functional level of rat liver tryptophan 2,3-dioxygenase messenger RNA during superinduction of enzyme with actinomycin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975; 72: 4285–4287
- [44] Kleeff J., Kornmann M., Sawhney H., Korc M.: Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2000; 86: 399–407
- [45] Krugh T.R., Hook J.W.III, Blakrishnan M.S., Chen F.M.: *Nucleic Acid Geometry and Dynamics*, red.: Sarma R. H., Pergamon Press, New York, 1980: 351–366
- [46] Krugh T.R., Mooberry E.S., Chiao Y.C.: Proton magnetic resonance studies of actinomycin D complexes with mixtures of nucleotides as models for the binding of the drug to DNA. *Biochemistry*, 1977; 16: 740–747
- [47] Lackner H.: Three-dimensional structure of the actinomycins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1975; 14: 375–386
- [48] Leoni L., Morosetti S., Palermo C., Sampaiole B., Savino M.: Specific interactions between DNA left-handed supercoils and actinomycin D. *Biophys. Chem.*, 1989; 33: 11–17
- [49] Liu C., Chen F.M.: Actinomycin D binds strongly and dissociates slowly at the dGpG site with flanking T/T mismatches. *Biochemistry*, 1996; 35: 16346–16353
- [50] Marsch G.A., Graves D.E., Rill R.L.: Photoaffinity approaches to determining the sequence selectivities of DNA-small molecule interactions: actinomycin D and ethidium. *Nucleic Acids Res.*, 1995; 23: 1252–1259
- [51] Mauger A.B., Gallagher K.S., Silverton J.V., Ferretti J.A.: Solution conformation of the actinomycin D related pentapeptide lactone using NMR and molecular modeling. *Biopolymers*, 1989; 28: 1771–1780
- [52] Meienhofer J., Atherton E.: Structure-affinity relationships in the actinomycins. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1973; 16: 203–300
- [53] Meienhofer J., Atherton E.: Structure-activity relationships among the semisynthetic antibiotics., red.: Perlman D., Academic Press, New York, 1977, 427–529
- [54] Mirau P.A., Shafer R.H.: High-resolution proton nuclear magnetic resonance analysis of conformational properties of biosynthetic actinomycin analogues. *Biochemistry*, 1982; 21: 2622–2626
- [55] Mirau P.A., Shafer R.H.: Role of actinomycin pentapeptides in actinomycin-deoxyribonucleic acid binding and kinetics. *Biochemistry*, 1982; 21: 2626–2631
- [56] Morgan C.D., Greene J.F.Jr., Measel J.W.Jr.: Induction of surface antigen CD69 expression in T-lymphocytes following exposure to actinomycin D. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1999; 21: 689–703
- [57] Muller W., Crothers D.M.: Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. *J. Mol. Biol.*, 1968; 35: 251–290
- [58] Nakazawa H., Chou F.E., Andrews P.A., Bachur N.R.: Chemical reduction of actinomycin D and phenoxazine analogues to free radicals. *J. Org. Chem.*, 1981; 46: 1493–1496
- [59] Narita Y., Asai A., Kuchino Y., Kirino T.: Actinomycin D and staurosporine, potent apoptosis inducers *in vitro*, are potentially effective chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2000; 45: 149–156
- [60] Osheroff N., Corbett A.H., Robinson M.J.: Mechanism of action of topoisomerases II – targeted antineoplastic drugs. *Adv. Pharmacol.*, 1994; 29 B: 105–126
- [61] Pan J.X., Liu Y., Zhang S.P., Tu T.C., Yao S.D., Lin N.Y.: Photodynamic action of actinomycin D: an EPR spin trapping study. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1527: 1–3
- [62] Patel D.J.: Proton and phosphorus NMR studies of d-CpG(pCpG)_n duplexes in solution. Helix-coil transition and complex formation with actinomycin D. *Biopolymers*, 1976; 15: 533–558
- [63] Peterson R.H., Biedler J.L.: Plasma membrane proteins and glycoproteins from Chinese hamster cells sensitive and resistant to actinomycin D. *J. Supramol. Struct.*, 1978; 9: 289–298
- [64] Philpott N.J., Turner A.J., Scopes J., Westby M., Marsh J.C., Gordon-Smith E.C., Dalgleish A.G., Gibson F.M.: The use 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 1996; 87: 2244–2251
- [65] Piro A.J., Taylor C.C., Belli J.A.: Interactions between radiation and drug damage in mammalian cells. I. Delayed expression of actinomycin D/x-ray effects in exponential and plateau phase cells. *Radiat. Res.*, 1975; 63: 346–362
- [66] Rill R.L., Hecker K.H.: Sequence-specific actinomycin D binding to single-stranded DNA inhibits HIV reverse transcriptase and other polymerases. *Biochemistry*, 1996; 35: 3525–3533
- [67] Robinson H., Gao Y.G., Yang X., Sanishvili R., Joachimiak A., Wang A.H.: Crystallographic analysis of a novel complex of actinomycin D bound to the decamer CGATCGATCG. *Biochemistry*, 2001; 40: 5587–5592
- [68] Roots R., Smith K.C.: Effects of actinomycin D on cell cycle kinetics and the DNA of Chinese hamster and mouse mammary tumor cells cultivated *in vitro*. *Cancer Res.*, 1976; 36: 3654–3658
- [69] Ruggiero Neto J., Colombo M.F.: Water regulation of actinomycin-D binding to DNA: the interplay among drug affinity, DNA long-range conformation, and hydration. *Biopolymers*, 2000; 53: 46–59
- [70] Sato H., Abe Y., Noguchi M., Kurokawa K., Sakai H.: Inhibitory effect of thyrotropic hormone on apoptosis induced by actinomycin D in a functioning rat thyroid cell line. *Endocr. J.*, 1999; 46: 309–315
- [71] Savino M., De Santis P., Leoni L., Palermo C.: Topology of DNA in its interaction with actinomycin D and with the histone octamer. *Macromolecular Biorecognition*, red.: Chaiken I., Chiancone E., Fontana A., Neri P., The Human Press Inc, 1988
- [72] Schafer M., Sheldrick G.M., Bahner I., Lackner H.: Crystal structures of actinomycin D and actinomycin Z3. *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 1998; 37: 2381–2384
- [73] Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H., Braun J., Giorgi J.V.: Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 1992; 13: 204–208
- [74] Schwartz H.S.: Some determinants of the therapeutic efficacy of actinomycin D (NSC-3053), adriamycin (NSC-123127), and daunorubicin (NSC-83142). *Cancer Chemother. Rep.*, 1974; 58: 55–62
- [75] Sehgal R.K., Sengupta S.K., Waxman D.J., Tauber A.I.: Enzymic and chemical reduction of 2-deamino-actinomycins to free radicals. *Anticancer Drug Des.*, 1985; 1: 13–25
- [76] Sha F., Chen F.M.: Actinomycin D binds strongly to d(CGACGACG) and d(CGTCGTCG). *Biophys. J.*, 2000; 79: 2095–2104
- [77] Shafer R.H., Burnette R.R., Mirau P.A.: Spectroscopic analysis of the equilibrium and kinetic DNA binding properties of several actinomycin analogs. *Nucleic Acids Res.*, 1980; 8: 1121–1132
- [78] Shen J., Wang J.C., Van Dyke M.W.: Identification of preferred actinomycin-DNA binding sites by the combinatorial method REPSA. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001; 9: 2285–2293
- [79] Sobell H.M.: The stereochemistry of actinomycin binding to DNA. *Cancer Chemother. Rep.*, 1974; 58: 101–116
- [80] Sobell H.M.: Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; 82: 5328–5331
- [81] Sobell H.M., Jain S.C.: Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. II. Detailed molecular model of actinomycin-DNA complex and its implications. *J. Mol. Biol.*, 1972; 68: 21–34
- [82] Stepanova N.G., Nikitin S.M., Valeeva F.S., Kartasheva O.N., Zhuze A.L., Zelenin A.V.: Application of 7-amino-actinomycin D for the fluorescence microscopical analysis of DNA in cells and polytene chromosomes. *Histochem. J.*, 1985; 17: 131–142
- [83] Takusagawa F., Dabrow M., Neidle S., Berman H.M.: The structure of a pseudo intercalated complex between actinomycin and the DNA binding sequence d(GpC). *Nature*, 1982; 296: 466–469

- [84] Takusagawa F., Goldstein B.M., Youngster S., Jones R.A., Berman H.M.: Crystallization and preliminary X-ray study of a complex between d(ATGCAT) and actinomycin D. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 4714–4715
- [85] Thompson E.B., Granner D.K., Tomkins G.M.: Superinduction of tyrosine aminotransferase by actinomycin D in rat hepatoma (HTC) cells. *J. Mol. Biol.*, 1970; 54: 159–175
- [86] Trask D.K., Muller M.T.: Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 1417–1421
- [87] Valeriotte F., Vietti T., Tolen S.: Kinetics of the lethal effect of actinomycin D on normal and leukemic cells. *Cancer Res.*, 1973; 33: 2658–2661
- [88] Wadkins R.M., Jares-Erijman E.A., Klement R., Rudiger A., Jovin T.M.: Actinomycin D binding to single-stranded DNA: sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 1996; 262: 53–68
- [89] Wadkins R.M., Jovin T.M.: Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry*, 1991; 30: 9469–9478
- [90] Wadkins R.M., Tung C.S., Vallone P.M., Benight A.S.: The role of the loop in binding of an actinomycin D analog to hairpins formed by single-stranded DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000; 384: 199–203
- [91] Wadkins R.M., Vladu B., Tung C.S.: Actinomycin D binds to metastable hairpins in single-stranded DNA. *Biochemistry*, 1998; 37: 11915–11923
- [92] Walker G.T., Stone M.P., Krugh T.R.: Interaction of drugs with Z-DNA: cooperative binding of actinomycin D or actinomine to the left-handed forms of poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dG-m5dG).poly(dG-m5dC) reverses the conformation of the helix. *Biochemistry*, 1985; 24: 7471–7479
- [93] Wassermann K., Markovits J., Jaxel C., Capranico G., Kolm K.W., Pommier Y.: Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II. *Mol. Pharmacol.*, 1990; 38: 38–45
- [94] Waterloh K., Fox K.R.: Secondary (non-GpC) binding sites for actinomycin on DNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992; 1131: 300–306
- [95] White R.J., Philips D.R.: Drug-DNA dissociation kinetics. *In vitro* transcription and sodium dodecyl sulphate sequestration. *Biochem. Pharmacol.*, 1989; 38: 331–334
- [96] Wilson W.D., Jones R.L.: Actinomycin D binding to oligonucleotides with 5'd(GCGC)3' sequences. Definitive ¹H and ³¹P NMR evidence for two distinct d(GC) 1:1 adducts and for adjacent site binding in a unique 2:1 adduct. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986; 108: 7114–7116
- [97] Wu M.H., Yung B.Y.: Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994; 270: 203–212
- [98] Yu F.L.: Actinomycin D-binding *in vivo*: active chromatin preferred. *FEBS Lett.*, 1983; 156: 83–87
- [99] Zelenin A.V., Kirianova E.A., Kolesnikov V.A., Stepanova N.G.: Use of actinomycin D for the specific quenching of fluorescence of deoxyribonucleic acid in cells stained with acridine aminoderivatives. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976; 24: 1169–1172
- [100] Zipper P., Bunemann H.: The interaction of actinomycin C3 and actinomine with DNA. A small-angle x-ray scattering study. *Eur. J. Biochem.*, 1975; 51: 3–17

