



УДК 547.963.3:577.113.6.088.53:543.422.25

СИКВЕНСПЕЦИФИЧНЫЕ КОНЪЮГАТЫ МАЛОБОРОЗДОЧНОГО ЛИГАНДА С ИНОЗИНСОДЕРЖАЩИМИ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ

© 1997 г. В. А. Рябинин, Ю. А. Горбунов, А. Н. Синяков[#]

Институт молекулярной биологии ГНЦ ВБ "Вектор", 633159, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 29.07.96 г. Принята к печати 30.01.97 г.

Получены конъюгаты аналога дистамицина, содержащего четыре карбоксамидопиррольных фрагмента (MGB), с инозинсодержащими олигодезоксирибонуклеотидами. Стабильность дуплексов, образуемых такими конъюгатами, падает в зависимости от состава инозинсодержащих пар в ряду $IC > IA \gg IT$. Для дуплексов $(d(TTTATATA)p(MGB))_2$, $(d(TTCICICI)p(MGB))_2$, $(d(TTAIAIAI)p(MGB))_2$ температуры плавления составляют 68, 54 и 35–45°C соответственно, $d(TTTITI-TI)p(MGB)$ не образует дуплекса при температурах выше 4°C. На примере дуплекса $d(GGCATC-TA)p(MGB) \cdot d(GGTAIATI)p(MGB)$ показано, что связывание протекает с высокой специфичностью – замена всего лишь одной А · Т-пары на А · А-пару приводит к снижению константы связывания почти в 1000 раз.

Ключевые слова: дистамицин, инозинсодержащие олигодезоксирибонуклеотиды, конъюгаты, стабильность дуплексов, селективность, малая бороздка.

Малобороздочные лиганды, связывающиеся с двухцепочечной ДНК, привлекают внимание многочисленных исследователей из-за возможности создания на их основе принципиально новых лекарственных препаратов, синтетических рестриктаз, осуществления с их помощью контроля процессов транскрипции, репликации и т.д. Выделенные из природных источников нетропсин и дистамицин А, использованные первоначально для таких исследований, были дополнены рядом синтетических аналогов, содержащих в своей основе не только N-метилпиррольный, но и имидазольный, оксазольный, пиридиновый и другие фрагменты [1–3]. Большое число работ было посвящено изменению и повышению специфичности связывания малобороздочных лигандов, так как и нетропсин и дистамицин комплексуются с дуплексами сайтами, содержащими практически только А · Т-пары. В настоящее время получены малобороздочные лиганды, специфично связывающиеся с сайтами, содержащими и G · C-пары [4–7]. Однако их константы связывания с соответствующими дуплексами значительно ниже константы связывания дистамицина с А · Т-сайтами [5].

Недавно нами были синтезированы конъюгаты олигодезоксирибонуклеотидов с малобороздочными лигандами – аналогами дистамицина А и исследована их способность образовывать дуплекс с одноцепочечной матрицей [8–10]. Было показано, что наличие такого лиганда в химерной молекуле существенно увеличивает стабильность дуплекса, состоящего только из А · Т-пар. Замена нескольких А · Т-пар на G · C-пары в участке связывания приводит к потере эффекта стабилизации из-за нарушения способности лиганда к комплексообразованию [8–10]. Поэтому для эффективного связывания конъюгата, содержащего производные дистамицина и олигонуклеотидный фрагмент, с одноцепочечной матрицей необходимы участки, состоящие лишь из А · Т-пар, что существенно сужает область применения таких конъюгатов. Расширить спектр сайтов одноцепочечной ДНК, способных образовывать прочный дуплекс с конъюгатами олигонуклеотидов и малобороздочных лигандов, сохранив при этом специфичность связывания, теоретически можно достичь путем синтеза соответствующих лигандов. Однако в настоящее время это сложная и далеко не решенная задача. Поэтому мы попытались найти другой способ расширения спектра сайтов на одноцепочечной олигонуклеотидной мишени, доступных для стабилизации аналогами дистамицина, за счет введения в состав дуплекса неканонических нуклеотидных пар.

Известно [11, 12], что одна из причин слабого связывания олигопирролкарбоксамидных лигандов с G · C-сайтами двухцепочечной ДНК – стерич-

Сокращения: MGB-H – 2-[4-фенилазо]бензилтио]этиловый эфир 6-[[1-метил-4-[1-метил-4-[1-метил-4-[1-метил-4-[(6-аминогексаноил)амино]пиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]амино]пиррол-2-карбонил]амино]гексановой кислоты. Префикс "d" в написании структур дезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (тел.: (383-2) 64-78-87, факс: +7(383-2) 32-88-31, e-mail: Sinyakov@vector.nsk.su).

ческие препятствия, обусловленные аминогруппой гуанина, расположенной на дне малой бороздки ДНК. Замена G · C-пар на I · C-пары приводит к тому, что и нетропсин и дистамицин легко встраиваются в малую бороздку олигонуклеотидных дуплексов [12, 13]. Поэтому, используя в составе конъюгатов олигонуклеотидов с олигопирролкарбоксамидными лигандами инозин вместо гуанозина, по-видимому, можно получать стабильные дуплексы с одноцепочечными ДНК-мишенями, содержащими три нуклеозидных остатка – аденозин, тимидин и цитидин. Это значительно облегчило бы выбор структуры адресованных олигонуклеотидов.

Цель настоящей работы – изучение селективности образования дуплексов из одноцепочечной олигонуклеотидной мишени и конъюгатов инозинсодержащих олигонуклеотидов с олигопирролкарбоксамидными лигандами.

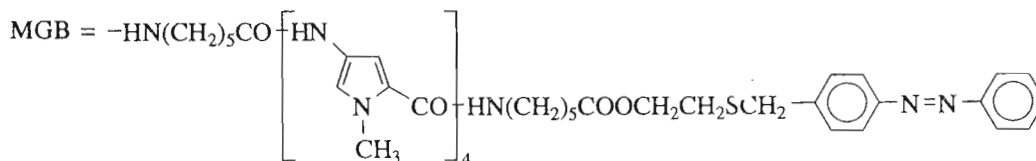
Олигопирролкарбоксамидсодержащие лиганды образуют с двухцепочечной ДНК комплексы различного состава от 1 : 1 до 3 : 1 [7, 14, 15]. Предполагается даже существование комплекса в соотношении 4 : 1 [16]. Ранее нами было показано [8], что конъюгаты аналогов дистамицина и олигодезоксирибонуклеотидов могут гибридизоваться с немодифицированными комплементарными олигонуклеотидами с образованием дуплекса, стабилизированного одной молекулой лиганда. Однако, если конъюгат частично самокомплементарен, более выгодно образование дуплекса только из молекул конъюгата. Об-

разующийся комплекс стабилизирован двумя молекулами лиганда, укладываемыми антипараллельно в малую бороздку ДНК [10, 15], и значительно более устойчив, чем комплекс конъюгат–ДНК, содержащий в малой бороздке лишь одну молекулу лиганда.

Прежде всего мы проанализировали возможность стабилизации инозинсодержащих дуплексов ковалентно присоединенными аналогами дистамицина на примере дуплексов, способных образовывать комплексы лиганд–дуплекс состава 2 : 1. В этом случае легко оценить порядок устойчивости различных олигонуклеотидных пар в комплексе с лигандом.

Прочность связывания в инозинсодержащих парах падает в ряду I · C > I · A > I · G ~ I · T [17]. Можно было ожидать, что аналогичные закономерности сохраняются и для олигонуклеотидов в составе конъюгатов с малобороздочными лигандами. Для проверки этого предположения в качестве модели нами были выбраны октануклеотиды (I)–(IV), содержащие в качестве тестового сайта альтернирующие инозинсодержащие гексануклеотидные последовательности, и их конъюгаты с MGB (V)–(VIII).

ТТГТТТр (I)	ТТТТТТр(MGB) (V)
ТТААААр (II)	ТТААААр(MGB) (VI)
ТТСЦСЦр (III)	ТТСЦСЦр(MGB) (VII)
ТТТАТААр (IV)	ТТТАТААр(MGB) (VIII)



В качестве малобороздочного лиганда использовали тетрапиррольный аналог дистамицина [18].

Частично комплементарные олигонуклеотиды (I)–(IV) и их конъюгаты с MGB (V)–(VIII) способны образовывать дуплексы, содержащие выступающие динуклеотидные 5'-концы. Стабильность дуплексов анализировали методом термической денатурации.

В таблице приведены температуры плавления олигонуклеотидов и их конъюгатов, а также рассчитанные исходя из кривых плавления термодинамические параметры образования дуплексов. Температуры плавления дуплексов, образуемых олигонуклеотидами (I)–(IV), не превышают 3–5°C. Пришивку лиганда по-разному влияет на стабильность дуплексов. MGB в составе конъюгата

(V), образованного из олигонуклеотида (I), существенно не влияет на стабильность его дуплекса. В то же время этот лиганд, ковалентно присоединенный к олигонуклеотиду (IV) (конъюгат VIII), повышает температуру плавления соответствующего дуплекса до 68°C (рисунок, таблица). Аналогичная стабилизация дуплекса наблюдается и в случае конъюгата (VII), содержащего I · C-пары. Для конъюгата (VI) дифференциальная кривая плавления характеризуется отсутствием четко выраженного максимума, что, по-видимому, свидетельствует об образовании ассоциатов различного состава, температура плавления которых ниже температуры плавления дуплекса, образованного конъюгатом (VII).

Из этих данных следует, что стабильность инозинсодержащих дуплексов с конъюгированными

Температуры плавления и термодинамические параметры (при 37 °С) дуплексов, образованных олигодезоксирибонуклеотидами и их конъюгатами с тетрапирролкарбоксимидным аналогом дистамицина

Структура дезоксирибонуклеотидов в дуплексе	$T_{пл}, ^\circ\text{C}^*$	$\Delta G, \text{ккал/моль}$	K, M^{-1}^{**}
ТТТТТТТТ Ip (I)	<4		
ТТАААААА Ip (II)	<4		
ТТСССССС Ip (III)	<3		
ТТТААААТ Ap (IV)	<3		
ТТТТТТТТ Ip (MGB) (V)	<5		
ТТАААААА Ip (MGB) (VI)	35–45		
ТТСССССС Ip (MGB) (VII)	53.7	-11.2	8×10^7
ТТТААААТ Ap (MGB) (VIII)	67.9	-12.9	1×10^9
GGCATCTA Ap (IX) GGTAIAT Ip (X)	<4		
GGCATCTA Ap (MGB) (XI) GGTAIAT Ip (MGB) (XII)	61.8	-12.2	4×10^8
GGCATCA Ap (XIII) GGTAIAT Ip (X)	<5		
GGCATCA Ap (MGB) (XIV) GGTAIAT Ip (MGB) (XII)	43.1	-8.2	6×10^5

* Температура, отвечающая максимуму первой производной кривой плавления.

** Константа устойчивости дуплекса.

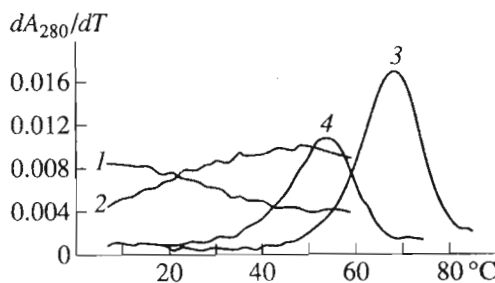
олигопиррольными лигандами уменьшается в ряду $I \cdot C > I \cdot A \gg I \cdot T$. Нами не рассмотрен случай пары $I \cdot G$ как в силу самой постановки задачи, так и с учетом данных [8–10] о неэффективности аналогов дистамицина в стабилизации конъюгатов, содержащих $G \cdot C$ -пары. Можно предполагать, что дуплексы, полученные из конъюгатов (VII) и (VIII), по-видимому, стабилизированы обеими молекулами лигандов аналогично проанализированным нами ранее комплексам [10, 19], и в частности комплексу, образованному частично самокомплементарным олигодезоксирибонуклеотидом GGCATATAp(MGB).

Для определения возможности стабилизации дуплекса, состоящего из $A \cdot T$ - и $I \cdot C$ -пар, MGB-лигандами, присоединенными ковалентно к олигонуклеотидам, нами были синтезированы олигонуклеотиды (IX), (X) и конъюгаты (XI), (XII). Кроме того, для исследования влияния некомплементарных пар на стабильность дуплекса были получены соединения (XIII) и (XIV).

GGCATCTA Ap (IX)	GGCATCTA Ap(MGB) (XI)
GGTAIAT Ip (X)	GGTAIAT Ip(MGB) (XII)
GGCATCA Ap (XIII)	GGCATCA Ap(MGB) (XIV)

Устойчивость комплексов определяли путем термической денатурации (таблица). Олигонуклеотиды (IX) и (X), не содержащие лигандов, образуют дуплекс при температуре ниже 4°С. Ковалентное присоединение лиганда к 3'-концам обеих цепей дуплекса приводит к явно выраженной

его стабилизации – температура плавления дуплекса составляет 62°С. Это обусловлено тем, что в его состав входят четыре $A \cdot T$ - и две $I \cdot C$ -пары, стабилизированные двумя молекулами тетрапиррольного аналога дистамицина. Величина температуры плавления комплекса занимает промежуточное положение между температурами плавления дуплексов, составленных только из $A \cdot T$ - и $I \cdot C$ -пар (68 и 54°С соответственно). Олигонуклеотиды (X) и (XIII), как и следовало ожидать, не образуют дуплекс при температуре выше 5°С. Эквимольная смесь этих олигонуклеотидов с присоединенными к 3'-концу MGB-лигандами (конъюгаты XII и XIV) дает кривую плавления дуплекса с максимумом при 43°С, что на 19°С ниже, чем



Дифференциальные кривые плавления дуплексов, образованных конъюгатами олигодезоксирибонуклеотидов с тетрапиррольным аналогом дистамицина. 1 – ТТТТТТТТ Ip(MGB) (V); 2 – ТТАААААА Ip(MGB) (VI); 3 – ТТТААААТ Ap(MGB) (VIII); 4 – ТТСССССС Ip(MGB) (VII). Условия см. "Экспер. часть".

для дуплекса, полученного из конъюгатов (XI) и (XII).

Полученные данные позволяют полагать, что одновременное наличие комплементарной гексануклеотидной последовательности и встраивание конъюгированного лиганда в малую бороздку дуплекса обуславливают максимальную стабильность дуплекса и, как следствие, высокую специфичность связывания конъюгата. Отсутствие одного из этих факторов существенно снижает стабильность дуплекса. Оценка величин констант образования дуплексов показывает, что конъюгаты аналогов дистамицина с инозинсодержащими олигонуклеотидами обладают высокой специфичностью к комплементарным им А, Т, С-содержащим олигонуклеотидам. Замена всего лишь одного из оснований на некомплементарное (замена А · Т-пары на А · А-пару в составе дуплекса), как видно из таблицы, снижает константу комплексообразования почти в 1000 раз.

Таким образом, получены конъюгаты мало-бороздочного лиганда, встраивающегося в малую бороздку ДНК, и инозинсодержащих олигонуклеотидов, связывающихся с последовательностями, содержащими основания А, Т и С. Данные экспериментов свидетельствуют о высокой специфичности и большой энергии связывания таких конъюгатов. Оптимизация специфичности и прочности связывания путем изменения структуры лиганда, природы и длины линкера, длины и состава олигонуклеотидов является предметом дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерчески доступные реактивы и растворители, при необходимости подвергая их дополнительной очистке по стандартным методикам. Синтез малобороздочного лиганда, его конъюгатов с олигонуклеотидами и их идентификацию проводили аналогично [18, 20]. По данным электрофореза, полученные конъюгаты являются индивидуальными соединениями, которые из-за наличия лиганда имеют пониженную подвижность по сравнению с исходными олигонуклеотидами (данные не приведены). Электронные спектры конъюгатов (H_2O ; λ_{max} 250–260 нм, ϵ 63 700–73 100 $M^{-1} cm^{-1}$ (в зависимости от структуры олигонуклеотидной части); λ_{max} 312 нм, ϵ 44 400 $M^{-1} cm^{-1}$) представляют собой суперпозицию электронных спектров свободных олигонуклеотидов и тетрапиррольного аналога дистамицина.

Растворы свободных олигонуклеотидов заданной концентрации в воде готовили разбавлением до определенной оптической плотности при 260 нм и 20°C, используя молярные коэффициенты, определенные согласно работе [21]. Водные

растворы смешивали с концентрированным буферным раствором. Конечный состав буферной смеси: 0.2 М NaCl, 10 мМ NaH_2PO_4 , 0.1 мМ EDTA, pH 7.0. Конечная концентрация каждого из олигонуклеотидов в растворе составляла 25 мкМ, а в случае самокомплементарных олигонуклеотидов – 50 мкМ. Аналогичным образом готовили растворы конъюгатов, определяя концентрацию по поглощению лигандной частью конъюгата в области 312 нм, где поглощение свободного олигонуклеотида отсутствует.

Определение термодинамической стабильности ДНК-дуплексов. Оптические кривые плавления регистрировали на специальной установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милхром". Установка имеет термостатированную кювету объемом 2 мкл. Температуру кюветы поддерживали за счет прокачивания теплоносителя жидкостным термостатом через кюветодержатель. Температуру измеряли медь-константановой термопарой, откалиброванной с абсолютной погрешностью 0.1°C и подключенной к цифровому вольтметру Щ-1516. Данные накапливали и обрабатывали с помощью персонального компьютера IBM 386. Каждую экспериментальную точку получали интегрированием сигнала за 10 с. Каждая кривая плавления содержала 500–800 точек. Данные сглаживали центральной линейной интерполяцией в интервале 2°C, делая поправку на тепловое расширение воды. Скорость нагрева растворов во всех случаях составляла 0.6–0.7°C/мин. Термодинамические характеристики определяли по методике, аналогичной приведенной в работе [18].

Авторы выражают благодарность С.Г. Лохову (ИБХ СО РАН) за регистрацию кривых плавления.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта 96-04-49953.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lown J.W. // *J. Mol. Recognit.* 1994. V. 7. P. 79–88.
2. Geierstanger B.H., Wemmer D.E. // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995. V. 24. P. 463–493.
3. Lown J.W. // *Drug Dev. Res.* 1995. V. 34. P. 145–183.
4. Mrksich M., Dervan P.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 3325–3332.
5. Lee M., Rhodes A.L., Wyatt M.D., Forrow S., Hartley J.A. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 4237–4245.
6. Wade W.S., Mrksich M., Dervan P.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 8783–8794.
7. Geierstanger B.H., Mrksich M., Dervan P.B., Wemmer D.B. // *Science.* 1994. V. 266. P. 646–650.

8. Sinyakov A.N., Lokhov S.G., Kutjavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B., Jr. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 4995–4996.
9. Lukhtanov E.A., Kutjavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B., Jr., Sinyakov A.N., Lokhov S.G. // *Int. Conf. "Therapeutic Oligonucleotides from Cell to Man"*, Seillac, France. 4–7 April. 1995. P. 1–6.
10. Sinyakov A.N., Ryabinin V.A., Lokhov S.G., Kutjavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B., Jr. // *III Int. Symp. Bioorg. Chem. Dagomys, Russia.* 17–23 September, 1995. P. 115.
11. Luck G., Triebel H., Waring M., Zimmer C. // *Nucl. Acids Res.* 1974. V. 1. P. 503–512.
12. Bailly C., Colson P., Henichart J.P., Houssier C. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 3705–3709.
13. Chen X., Ramakrishnan B., Rao S.T., Sundaralingam M. // *Nature Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 169–175.
14. Zasedatelev A.S., Borodulin V.B., Grokhovsky S.L., Nikitin A.M., Salmanova D.V., Zhuze A.L., Gursky G.V., Shafer R.H. // *FEBS Lett.* 1995. V. 375. P. 304–306.
15. Rentzeperis D., Marky L.A., Dwyer T.J., Geierstanger B.H., Pelton J.G., Wemmer D.E. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 2937–2945.
16. Blasko A., Bruice T.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 10018–10022.
17. Case-Green S.C., Southern E.M. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 131–136.
18. Синяков А.Н., Рябинин В.А., Серегин С.В., Лохов С.Г., Кутявин И.В., Гэмпер Х.Б., Мейер Р.Б. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 544–552.
19. Синяков А.Н., Рябинин В.А., Горбунов Ю.А., Лохов С.Г., Бакланов М.М., Бабкина И.Н., Сандахчиев Л.С. // *Докл. РАН.* 1997. Т. 352.
20. Годовикова Т.С., Зарьтова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
21. Лохов С.Г., Кошкин А.А., Кутявин И.В., Митянин М.П., Подыминогин М.Ф., Лебедев А.А. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 197–205.

Sequence-Specific Conjugates of Minor Groove Ligands with Inosine-Containing Oligodeoxyribonucleotides

V. A. Ryabinin, Yu. A. Gorbunov, and A. N. Sinyakov

Institute of Molecular Biology, Vector State Research Center for Biotechnology and Virology, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

Abstract—Conjugates of the distamycin tetrapyrrole analogue containing four pyrrolicboxamide fragments (MGB) with inosine-containing oligodeoxyribonucleotides were synthesized. The stability of duplexes formed by these conjugates depends on the composition of inosine-containing pairs and decreases in the order: IC > IA ≫ IT. For the duplexes (d(TTTATATA)_p(MGB))₂, (d(TTCICICI)_p(MGB))₂, and (d(TTAIAIAI)_p(MGB))₂, the melting temperatures are 68, 54, and 35–45°C, respectively; (d(TTTTTI)_p(MGB))₂ forms no duplexes at temperatures above 4°C. The binding was shown to be highly specific: in the duplex d(GGCATCTA)_p(MGB) · d(GG-TAIAI)_p(MGB), the substitution of only one A · T pair by A · A decreases the binding constant by almost three orders of magnitude.

Key words: *distamycin, inosine-containing oligodeoxyribonucleotides, conjugates, duplex stability, selectivity, minor groove*