



УДК 615.33:577.182.48('15+17):577.113.7

ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ОПРЕДЕЛЕННЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК. XI. СИНТЕЗ И СВЯЗЫВАНИЕ С ДНК БИС-НЕТРОПСИНОВ, В КОТОРЫХ НЕТРОПСИНОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ СОЕДИНЕНЫ МЕЖДУ СОБОЙ ПО С-КОНЦАМ ТЕТРА- ИЛИ ПЕНТАМЕТИЛЕНОВЫМИ ЗВЕНЬЯМИ

© 2002 г. С. Л. Гроховский*,***, В. А. Николаев*, Б. П. Готтих*, А. Л. Жузе*

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

** Центр медицинских исследований Университета Осло, 119991, Москва, ул. Вавилова, 34/5

Поступила в редакцию 12.10.2001 г. Принята к печати 04.02.2002 г.

Синтезированы бис-нетропсины, содержащие между С-концами нетропсиновых фрагментов соединительные цепи из четырех или пяти метиленовых звеньев и остатки глицина или *L*-лизилглицина на *N*-концах. Методом футпринтинга исследована специфичность связывания бис-нетропсинов со специально сконструированными фрагментами ДНК, содержащими различные кластеры А · Т-пар оснований, и обнаружено влияние длины соединительной цепи на связывание бис-нетропсинов. Бис-нетропсин с тетраметиленовым мостиком обладает более сильным защитным действием, чем бис-нетропсин с пентаметиленовым мостиком. Показано, что синтезированные бис-нетропсины прочнее связываются с последовательностью 5'-А₄Т₄-3', тогда как бис-нетропсин, содержащий соединительную цепь между *N*-концами нетропсиновых фрагментов, как было показано ранее, прочнее связывается с последовательностью 5'-Т₄А₄-3'.

Ключевые слова: лиганды, сиквенс-специфичные к ДНК, нетропсин, дистамицин А, бис-нетропсины, химический синтез, футпринтинг.

ВВЕДЕНИЕ

Природные антибиотики нетропсин и дистамицин А образуют прочные нековалентные комплексы с А · Т-богатыми участками двухспиральной ДНК [2–10]. Базируясь на молекулярной модели для комплексов нетропсина и дистамицина А с ДНК, согласно которой в комплексах молекулы антибиотиков располагаются вдоль малого желоба спирали ДНК [4], была предложена структура нового класса соединений, которые должны предпочтительно узнавать определенные кластеры А · Т-пар оснований ДНК. Общий принцип построения такого рода соединений заключается во включении между фрагментами, состоящими из одного или нескольких пиррол-карбоксамидных блоков, различных соединительных звеньев, которые позволяют определенным образом ориентировать и фиксировать эти фрагменты в комплексе с ДНК.

Первыми из этого класса соединений были синтезированы бис-нетропсины, представляющие собой две молекулы аналога нетропсина, связанные по *N*-концам остатками алифатических дикарбоновых кислот с различным числом метиленовых звеньев [11]. Изучение физико-химических [6, 12] и биохимических [6, 13–16] свойств комплексов этих веществ с ДНК показало, что нетропсиновые фрагменты специфично связываются с двумя кластерами из А · Т-пар оснований. Впоследствии этот подход был успешно использован и в других лабораториях для создания сиквенс-специфичных соединений на основе различных комбинаций пиррол- и имидазолкарбоксамидных блоков [7, 17–20].

В настоящей работе описывается синтез и исследование специфичности связывания с ДНК бис-нетропсинов, в которых нетропсиновые фрагменты, соединены по С-концам остатками α, ω -диаминоalkanов разной длины и содержат на *N*-концах остатки глицина или *L*-лизилглицина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химические формулы нетропсина, дистамицина А и синтезированных нами бис-нетропсинов (I), (Ia), (II) и (IIa), содержащих два нетропсиновых

Сообщение X см. [1].

Сокращения: Arc – 1-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновая кислота; CDI – *N,N'*-карбонилдинимдазол; НОВт – 1-гидроксизензотриазол; Im – имидазол; Нрс – 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновая кислота. Все нуклеотидные последовательности приведены в направлении 5' → 3'.

Автор для переписки (эл. почта: grokhovs@imb.ac.ru; факс: (095) 135-14-05; тел.: (095) 135-97-18).

фрагмента, состоящих из двух *N*-пропилпирролкарбоксамидных блоков, связанных цепочками из пяти (в (I), (II)) и четырех (в (Ia) (IIa)) метиленовых звеньев, представлены на рис. 1. Отличие каждого ди-*N*-пропилпирролкарбоксамидного блока от молекулы нетропсина состоит не только в изменении *S*-концевой части молекулы и в замене метильных остатков у атомов азота пирролов на *n*-пропильные, но и в замене присутствующего в нетропсине

остатка гуанидилуксусной кислоты на остаток глицина (в (I), (Ia)) или *L*-лизилглицина (в (II), (IIa)). Согласно данным рентгеноструктурного анализа комплексов олигонуклеотидов с нетропсином [21] и дистамицином А [22], такие изменения в структуре аналогов не должны были сказываться на специфичности этих соединений к А · Т-парам оснований ДНК, обусловленной образованием водородных связей между атомами азотов амидных групп

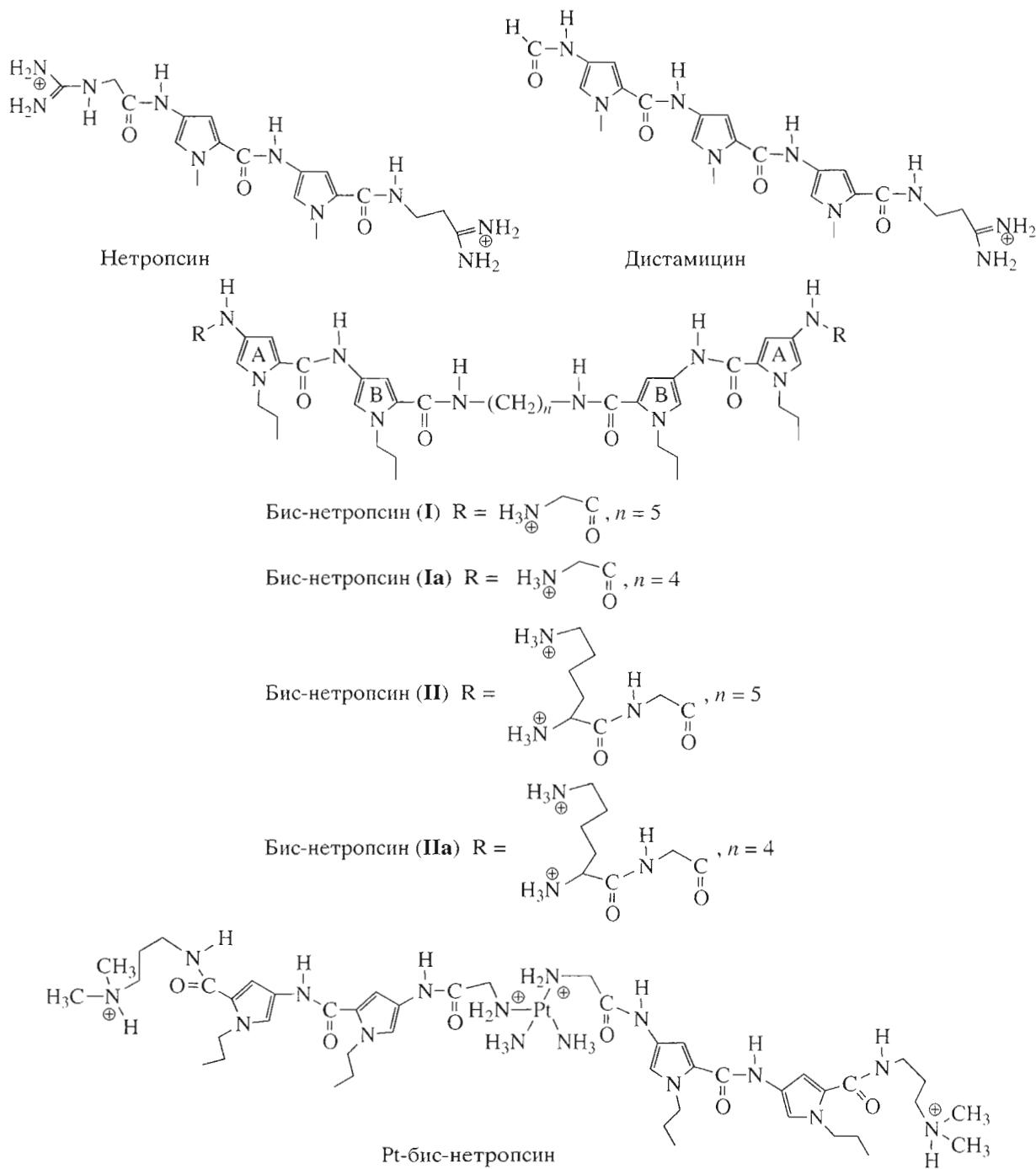


Рис. 1. Химические формулы нетропсина, дистамицина и бис-нетропсинов.

лигандов и акцепторными группами пар оснований в малом желобе ДНК. Кроме того, синтез *N*-пропильных производных 4-нитро- и 4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты проходит по нашим данным [3] с лучшими выходами по сравнению с соответствующими *N*-метильными производными, а замена концевой гуанидиногруппы на аминогруппу позволяет в дальнейшем проводить ее модификацию с целью синтеза более сложных ДНК-специфичных лигандов.

Синтез бис-нетропсинов

Синтез бис-нетропсинов (I) и (II) с пентаметиленовым мостиком был осуществлен по схеме 1.

По аналогичной схеме был проведен и синтез бис-нетропсинов с тетраметиленовым мостиком. В дальнейшем гомологичные соединения, содержащие вместо остатка 1,5-пентаметилендиамина (кадаверина) остаток 1,4-тетраметилендиамина (путресцина), отмечены индексом "а". Имидазолид соединения (III), синтез которого описан ранее [23], конденсировали в DMF с кадаверином. Выход динитросоединения (IV) – 59, а соединения (IVa) – 46%. При синтезе соединения (IV) из реакционной смеси было выделено также моноацильное производное кадаверина (соединение (V)) с выходом 12%. После восстановления нитрогрупп соединений (IV) и (IVa) гидрированием над катализатором Адамса полученные диаминопроиз-

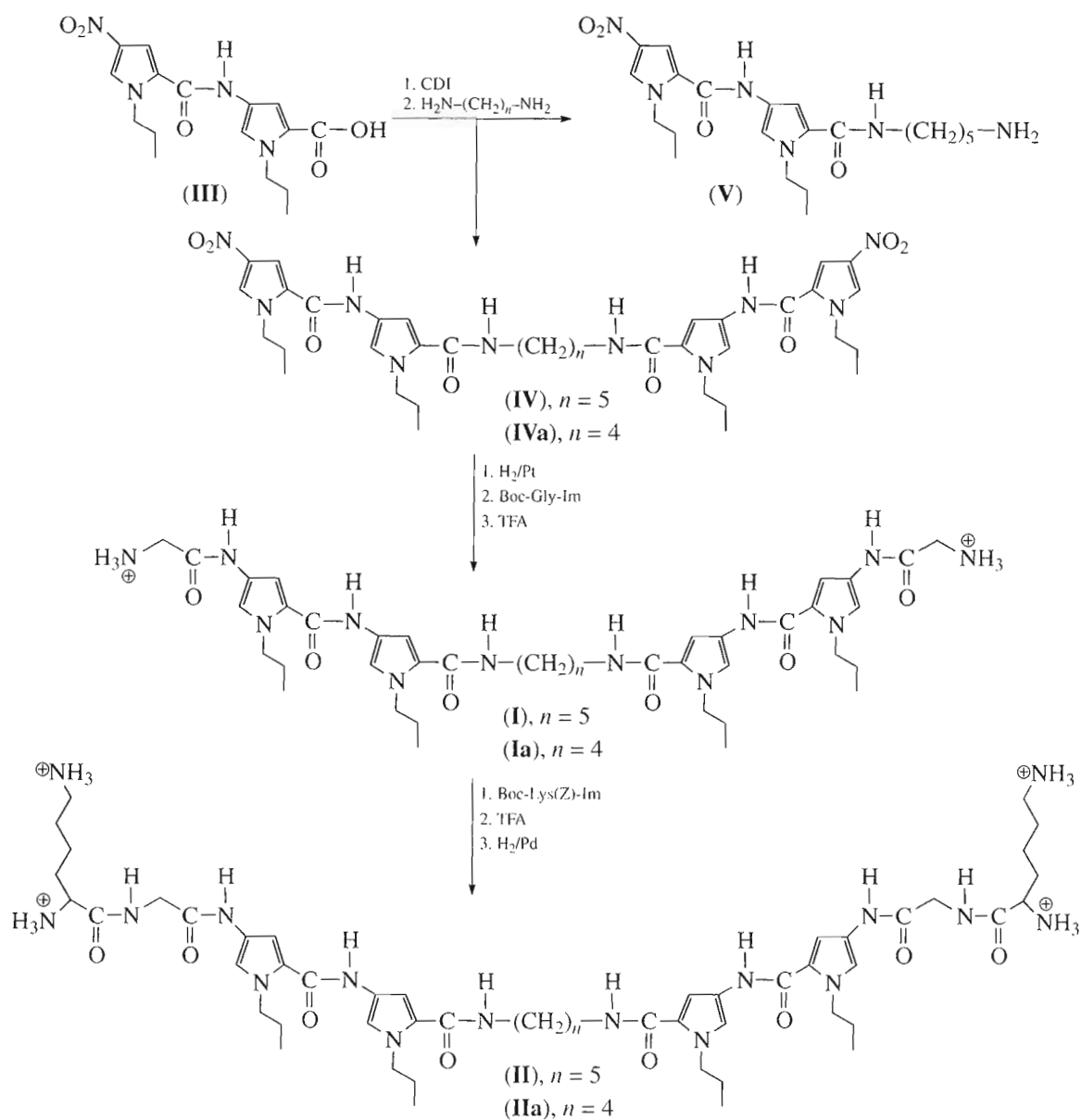


Схема 1.

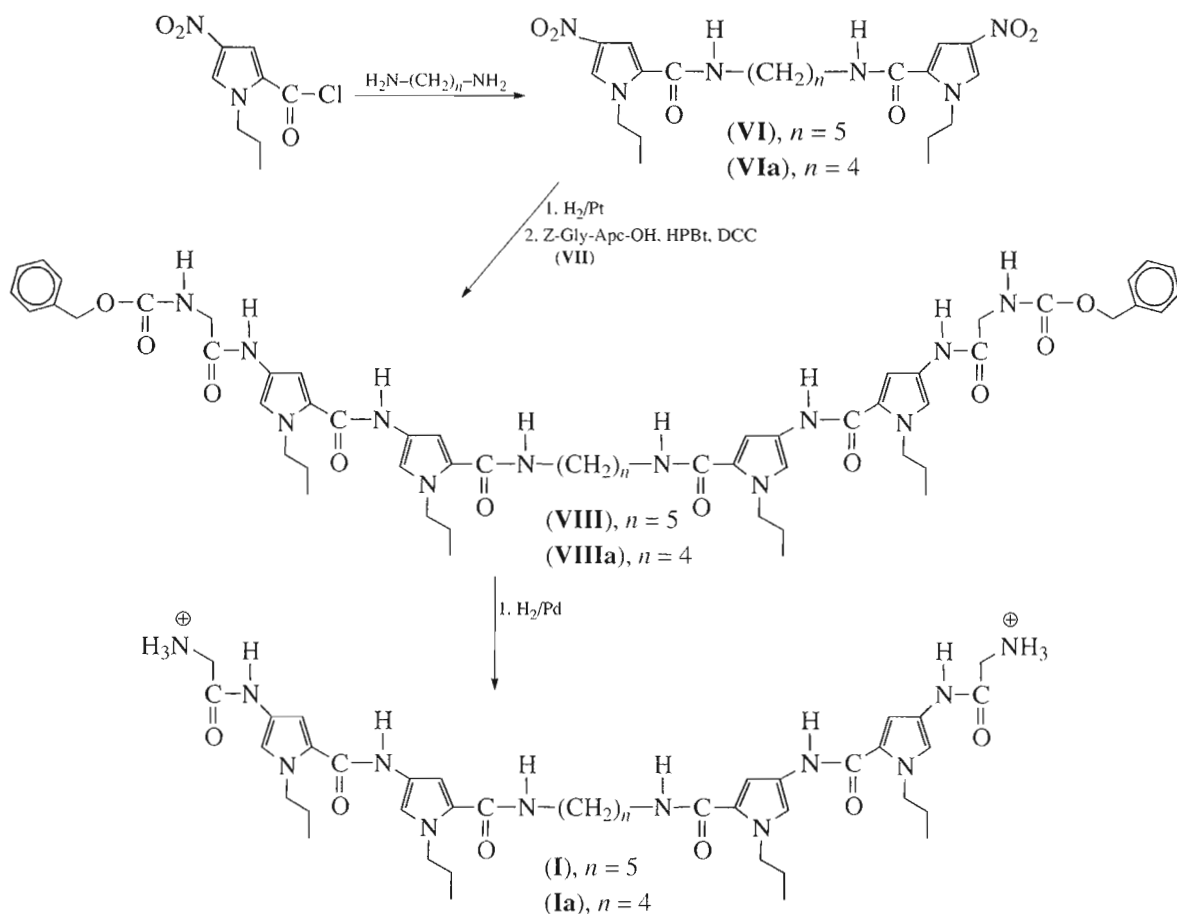


Схема 2.

водные без выделения конденсировали с имидазолидом Вос-глицина. После удаления защитных групп соединения (I) и (Ia) были получены с выходами 32 и 24% соответственно.

Синтезированные соединения плохо растворялись в воде при нейтральных значениях pH, однако введение в молекулу двух остатков лизина по аминогруппам глицинов с помощью *N,N'*-карбонилдимидазола существенно улучшило растворимость бис-нетропсина (I) и (Ia).

Синтез бис-нетропсина (I) и (Ia) был проведен также по схеме 2. После конденсации хлорангидрида 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты с кадаверином или путресцином динитросоединения (VI) и (VIa) восстанавливали над катализатором Адамса и полученные диаминопроизводные без выделения конденсировали карбодимидным методом с Z-Gly-Apc-OH (VII). Бис-нетропсина (I) и (Ia) были получены из соединения (VIII) и (VIIIa) соответственно после удаления бензилоксикарбонильных групп каталитическим гидрированием над палладиевым катализатором. Суммарные выходы бис-нетропсина (I) по схемам 1 и 2 составили 19 и 28%, а бис-нетропсина (Ia) – 11 и 24% соответственно.

Специфичность связывания бис-нетропсина с ДНК

Специфичность связывания бис-нетропсина с ДНК

Для определения последовательностей ДНК, к которым бис-нетропсина проявляют наибольшее сродство, прежде необходимо определить последовательности, к которым нетропсинальный фрагмент, состоящий из двух пирролкарбоксамидных блоков, имеет наибольшее сродство. Согласно данным рентгеноструктурного анализа комплексов нетропсина и дистамицина с различными двухспиральными олигодезоксирибонуклеотидами, амидные группы антибиотиков могут образовывать бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с соседними атомами N3 аденина и/или атомами O2 тимина смежных А · Т-пар оснований противоположных цепей ДНК [21, 22]. Из данных ЯМР [24], а также футпринтинга с использованием ДНКазы I [14, 25–28] и гидроксильных радикалов [29] следует, что нетропсин связывается в малом желобе ДНК с сайтом, состоящим из четырех А · Т-пар оснований. Константы свя-

зывания нетропсина с такими сайтами зависят от взаимного расположения остатков аденина и тимина в разных цепях ДНК [26]. Наиболее прочное связывание наблюдается для сайтов, содержащих тимины только в одной из цепей, и для сайтов, содержащих в своей структуре последовательность АТ. Присутствие в сайте последовательности ТА ослабляет связывание [26]. Конформационные расчеты [30], рентгеноструктурные данные [31] и данные по расщеплению фрагментов ДНК гидроксильными радикалами [32] свидетельствуют о том, что сайты связывания, содержащие последовательности ТТ или последовательность АТ, имеют зауженный малый желоб, по размерам соответствующий толщине молекулы нетропсина. При встраивании нетропсина в такой желоб образуются многочисленные ван-дер-ваальсовы контакты, что приводит к образованию прочного комплекса [24]. Вышесказанное относится и к связыванию с ДНК дистамицина, за исключением того, что он узнает не четыре, а пять А · Т-пар оснований.

Сайты связывания, содержащие пиримидин-пуриновые последовательности ТА и/или GC, имеют расширенный малый желоб, что обусловлено небольшим перекрытием соседних пар оснований. Для дистамицина и ряда его аналогов методом ЯМР было обнаружено встраивание в такой расширенный малый желоб параллельно бок-о-бок двух молекул антибиотика [33]. Мономерное связывание нетропсина и дистамицина с последовательностями, содержащими G · C-пары оснований, энергетически не выгодно из-за стерических препятствий, создаваемых 2-аминогруппой гуанина, расположенной в малом желобе ДНК [4, 21], тогда как с сайтами, имеющими расширенный малый желоб, возможно димерное связывание [34].

При мономерном связывании с непалиндромными последовательностями ДНК, например с ТТТТ, молекула лиганда может встраиваться в малый желоб в двух ориентациях [24]. Введение в одну из концевых частей молекулы нетропсина или дистамицина группировки, способной расщеплять сахарофосфатный остов ДНК, кроме определения специфичности связывания, позволяет определить и ориентацию молекулы в малом желобе ДНК [35–37]. В случае последовательности ТТТТ молекулы аналогов нетропсина преимущественно ориентированы вдоль желоба таким образом, что их амидиновая часть (С-конец) находится у 5'-конца этой последовательности. Поэтому бис-нетропсины, в которых два нетропсиновых фрагмента соединены друг с другом в разных ориентациях, должны иметь наибольшее сродство к разным сайтам. Кроме того, из исследований поведения дуплексов, содержащих октануклеотиды с обращенной полярностью (A_4T_4 и T_4A_4), методом замедления в полиакриламидном геле [38] и методами молекулярного мо-

делирования [30, 39] следует, что полярность нуклеотидной последовательности может быть важным параметром, определяющим структуру и кривизну ДНК, что должно сказываться при связывании протяженных лигандов вдоль малого желоба спирали ДНК.

На сродство бис-нетропсинов к различным последовательностям ДНК, кроме вклада каждого из двух нетропсиновых фрагментов, большое влияние оказывает природа соединительной цепи. При связывании с ДНК возможно существование нескольких структур комплексов бис-нетропсинов при их локализации в малом желобе:

1) Оба нетропсиновых фрагмента образуют специфичные комплексы с ДНК. Для реализации такой возможности ДНК должна содержать два рядом расположенных сайта узнавания и соединительная цепь не должна мешать взаимному связыванию. Наличие слишком длинной соединительной цепи может привести к тому, что вторая половина бис-нетропсина будет способна связываться с несколькими близко расположенными сайтами. Для уменьшения числа возможных вариантов нами были выбраны сравнительно короткие соединительные цепи, хотя это и увеличивало вероятность того, что связывание одного блока будет препятствовать специфическому связыванию другого.

2) Если имеется только одно место связывания или соединительная цепь мешает связыванию второй половины бис-нетропсина, то прочно связываться с ДНК будет только один из нетропсиновых фрагментов, а второй будет выступать из желоба или находиться в нем, но не образовывать специфических контактов.

3) Для бис-нетропсинов возможно встраивание в малом желобе двух нетропсиновых фрагментов бок-о-бок и образование шпилек.

4) Связывание с одновременным встраиванием бок-о-бок нетропсиновых фрагментов из разных молекул бис-нетропсинов в одном сайте связывания.

Ранее с помощью статистического анализа большого числа мест связывания нами было установлено, что Pt-бис-нетропсин, в котором два нетропсиновых фрагмента связаны по N-концевым частям через остаток *цис*-диамминоплатины(II) (см. рис. 1), образует наиболее прочный комплекс с последовательностью T_4A_4 [40]. В молекулах бис-нетропсинов (II) и (IIIa) нетропсиновые фрагменты, связанные по C-концам, ориентированы в противоположных направлениях. Поэтому можно было ожидать, что такие бис-нетропсины будут образовывать более прочные комплексы с последовательностью A_4T_4 .

Для исследования связывания различных бис-нетропсинов с ДНК нами были сконструированы плазмиды, в полилинкерную область которых было введено несколько потенциальных сайтов

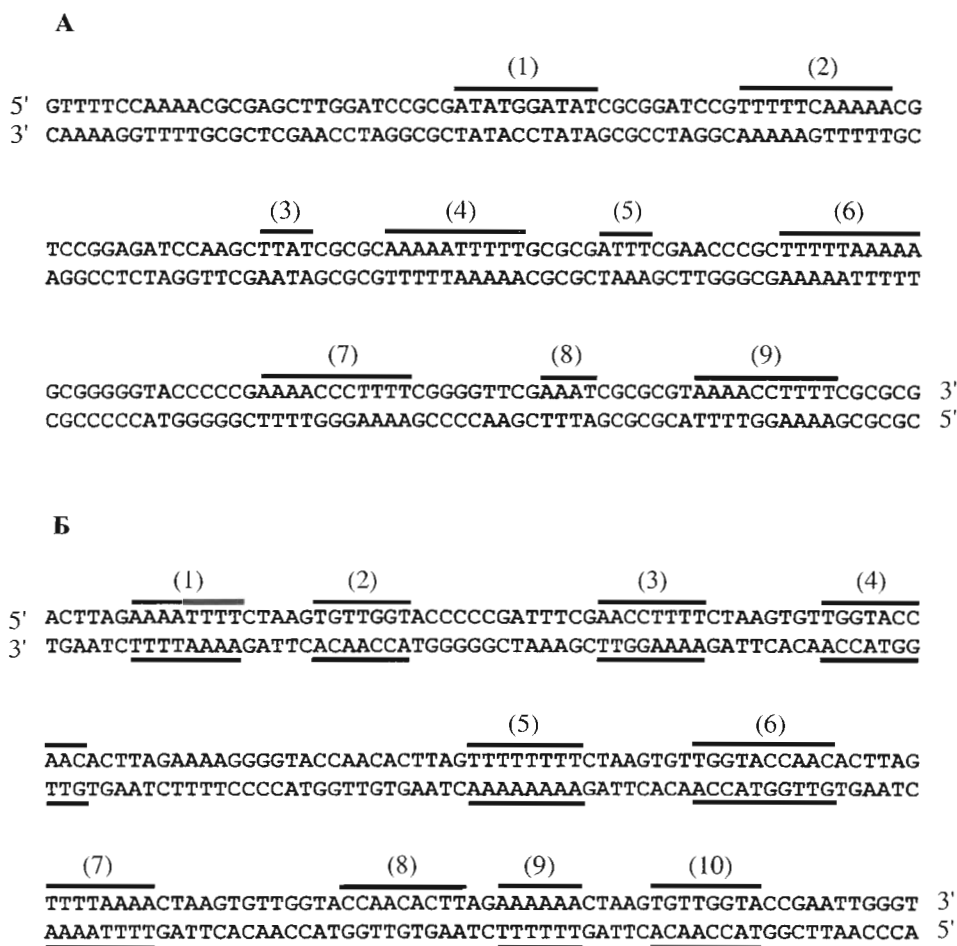


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности рестриктных фрагментов ДНК А и Б. Отмечены и пронумерованы участки последовательностей, обозначенные на рис. 3–7.

связывания [28]. Каждый сайт содержит по два места связывания для нетропсина, состоящих из разных последовательностей из четырех или пяти А · Т-пар оснований, находящихся рядом или отстоящих друг от друга на одну, две или три G · С-пары. Эти области плазмид включают в себя и последовательности, содержащие в различных комбинациях четыре А · Т-пары оснований, окруженных кластерами с высоким содержанием G · С-пар. Последовательности двух сконструированных фрагментов ДНК А и Б приведены на рис. 2.

Специфичность связывания бис-нетропсинов (II) и (IIa) на ДНК-фрагменте А

На рис. 3 приведены профили расщепления верхней цепи радиоактивно меченного ДНК-фрагмента А гидроксильными радикалами в присутствии бис-нетропсинов (II) и (IIa) в различных концентрациях, а на рис. 4 – профили расщепления этого же фрагмента ДНКазой I. Как видно из профилей расщепления фрагмента А, в присутст-

вии бис-нетропсинов (II) и (IIa) реализуются, по-видимому, все четыре вышеуказанных варианта структур комплексов бис-нетропсинов с ДНК. При концентрациях лигандов 8–10 мкМ, что соответствует примерно 1 молекуле лиганда на 4 п.о. ДНК, наблюдается сильная защита от расщепления всего фрагмента А, даже последовательностей, содержащих G · С-п.о. При таких уровнях насыщения возможно образование различных видов димерных или многомерных [41] малоспецифичных комплексов.

При уменьшении концентрации бис-нетропсинов до 4–5 мкМ они защищают от расщепления только участки, содержащие подряд не менее четырех А · Т-п.о. При этом бис-нетропсин (IIa), содержащий соединительную цепь из четырех метиленовых звеньев, проявляет более сильное защитное действие, чем бис-нетропсин (II), с пятью метиленовыми звеньями (см. рис. 4).

Наиболее прочно эти соединения связываются с последовательностью A₅T₅ (сайт (4)): бис-нетропсин (II) при концентрации 1.2 мкМ, а бис-не-

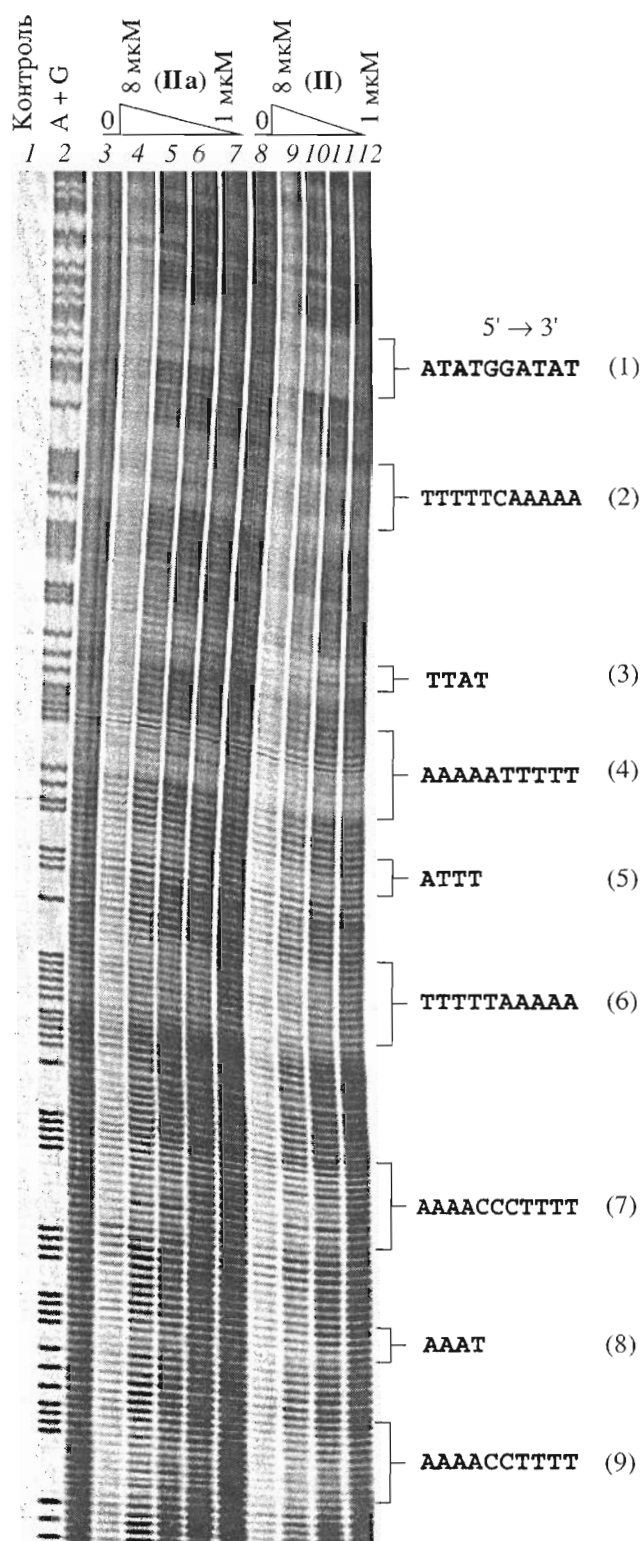


Рис. 3. Профили расщепления гидроксильными радикалами верхней цепи ДНК-фрагмента А: 1 – исходный фрагмент без обработки; 2 – “А + G” – химическое расщепление по пуринам; 3, 8 – расщепление свободного фрагмента; 4–7 и 9–12 – расщепление фрагмента в присутствии 8, 4, 2, 1 мкМ бис-нетропсина (IIa) и (II) соответственно.

тропсин (IIa), содержащий четыре метиленовых звена, уже при концентрации 0.6 мкМ, при этом лиганд защищает от расщепления примерно 7 п.о. В последовательностях T_5A_5 (сайт (6)) и T_5CA_5 (сайт (2)) бис-нетропсин (IIa) при концентрации 2.5 мкМ защищает от расщепления только участок из 4 п.о., находящийся на 3'-конце. Возможно, как и для последовательности TTAT (сайт (3)) это свидетельствует об образовании структуры типа шпильки [42]. Косвенным подтверждением этого является усиление расщепления гидроксильными радикалами прилегающих участков, что свидетельствует об уширении малого желоба. Для последовательности AAAT (сайт (8)) такого усиления расщепления не наблюдается. По-видимому, в этом случае в связывании принимает участие только один из нетропсиновых фрагментов. Для последовательности ATATGGATAT (сайт (1)) наблюдается защита примерно 10 п.о. со слабым расщеплением в центре этой последовательности. В данном случае происходит, вероятно, связывание двух молекул бис-нетропсина в виде шпилек [43].

В целом, эти данные свидетельствуют о том, что бис-нетропсины (II) и (IIa) проявляют большее сродство к последовательности A_5T_5 по сравнению с последовательностью T_5A_5 . Тем не менее это различие выражено гораздо слабее, чем в случае Pt-бис-нетропсина, содержащего нетропсиновые фрагменты в противоположной ориентации и проявляющего четко выраженное сродство к последовательности T_5A_5 [40]. Это обусловлено, вероятно, неспособностью примененных линкеров обеспечить оптимальный переход для “чтения” двух AT-кластеров двумя нетропсиновыми фрагментами, находящимися в противоположной ориентации. В случае же Pt-бис-нетропсина, кроме оптимальной ориентации нетропсиновых фрагментов, объемистая *цис*-диаминоплатиновая группировка удачно встраивается в расширение малого желоба, обусловленного последовательностью ТА, и позволяет каждому из нетропсиновых блоков образовывать прочные специфические контакты.

Специфичность связывания бис-нетропсина (II) и (IIa) на ДНК-фрагменте Б

Поскольку анализ мест защиты от расщепления фрагмента А показывает, что бис-нетропсины (II) и (IIa) связываются и с последовательностями, содержащими чередующиеся А·Т- и G·С-пары оснований, мы провели подобный анализ и для фрагмента Б, содержащего много таких последовательностей. На рис. 5 приведены профили расщепления верхней цепи радиоактивно меченного фрагмента Б ДНКазой I в присутствии бис-нетропсина (II) и (IIa) в различных концентрациях, а на рис. 6 – то же самое для нижней цепи фрагмента Б. На рис. 7 представлены профили

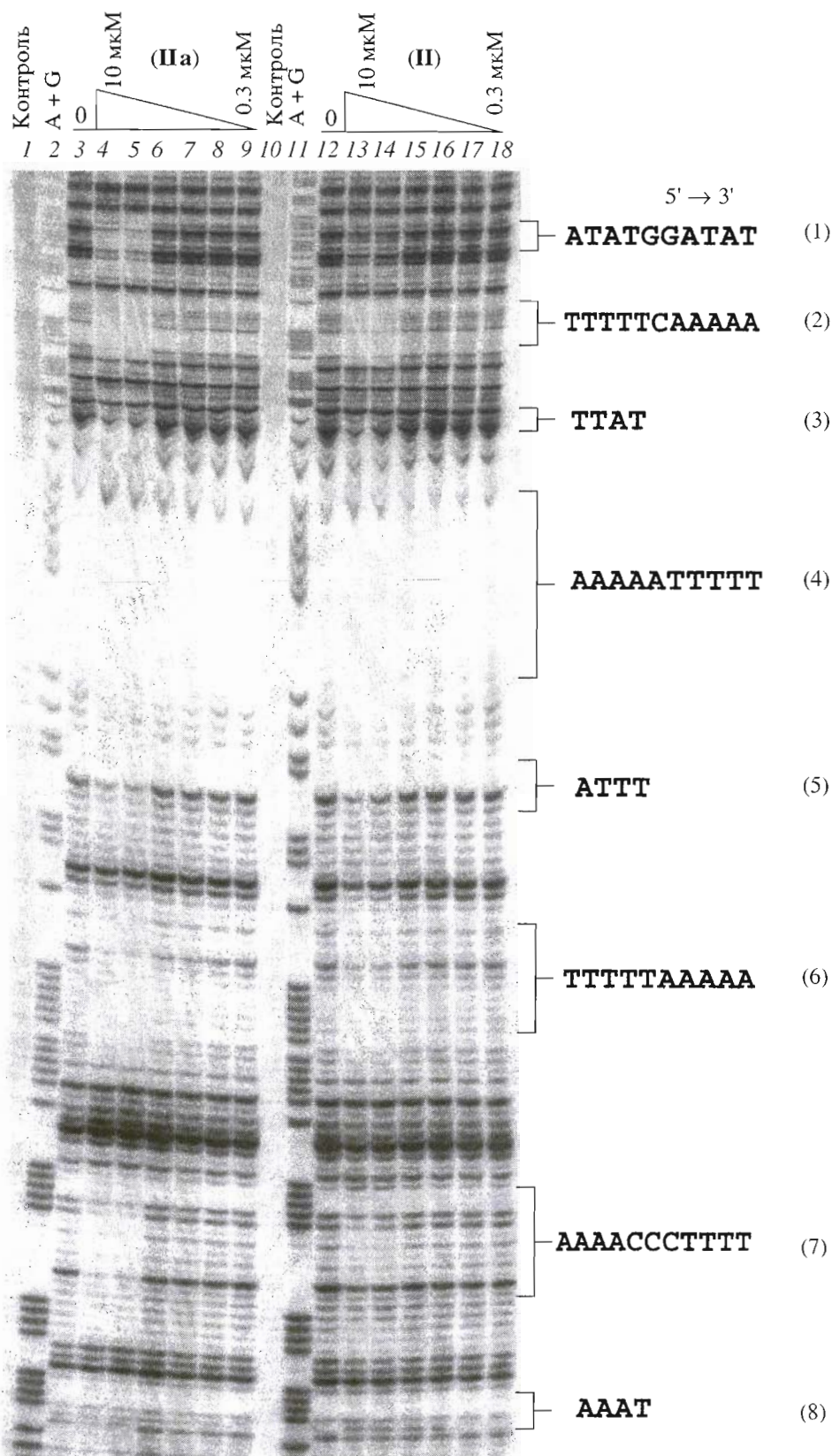


Рис. 4. Профили расщепления ДНКазой I верхней цепи ДНК-фрагмента А: 1, 10 – исходный фрагмент без обработки; 2, 11 – химическое расщепление по пуринам; 3, 12 – расщепление свободного фрагмента; 4–9 и 13–18 – расщепление фрагмента в присутствии 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 и 0.31 мкМ бис-нетропсинов (IIa) и (II) соответственно.

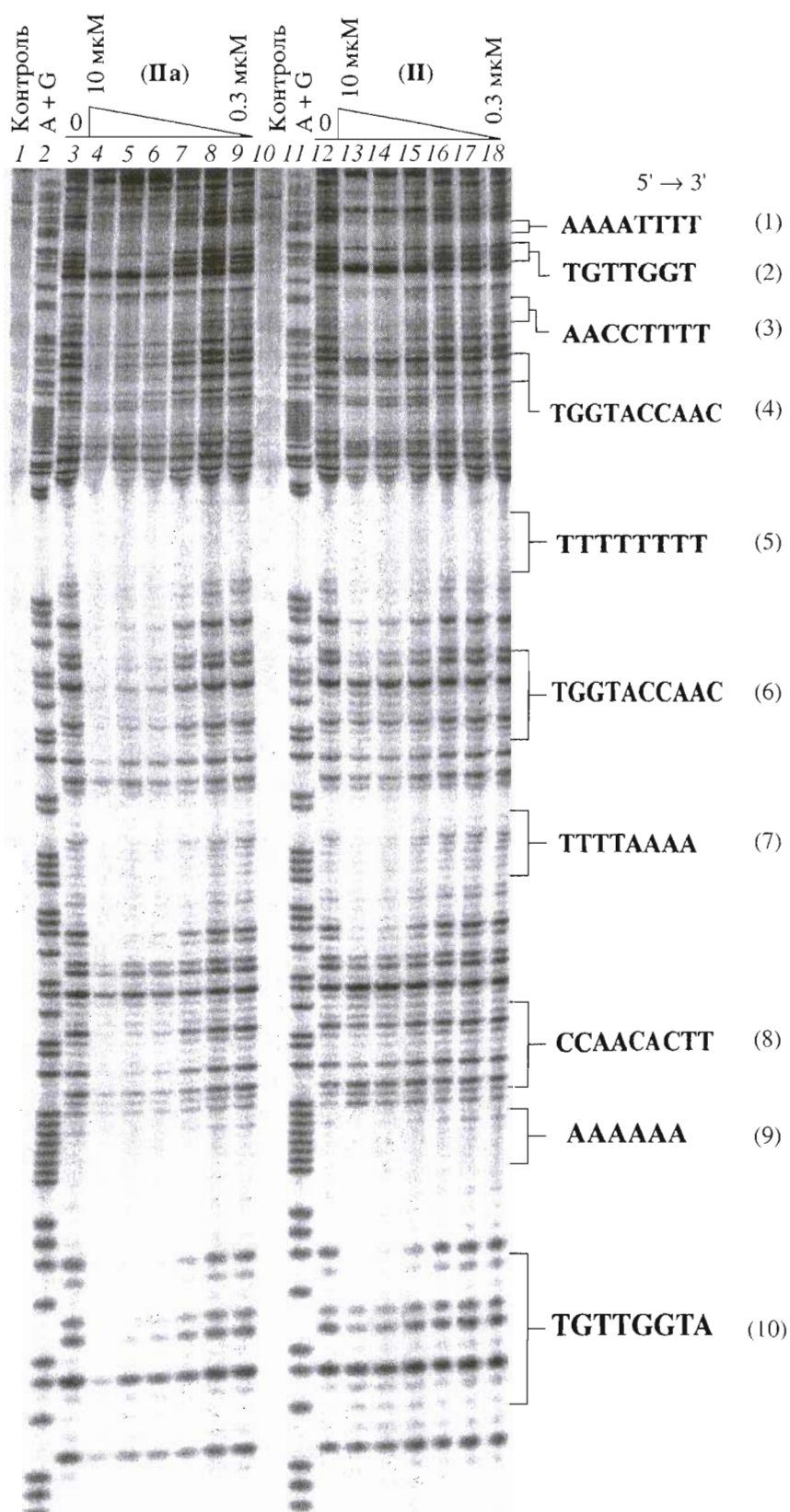


Рис. 5. Профили расщепления ДНКазой I верхней цепи ДНК-фрагмента Б: 1, 10 – исходный фрагмент без обработки; 2, 11 – химическое расщепление по пуринам; 3, 12 – расщепление свободного фрагмента; 4–9 и 13–18 – расщепление фрагмента в присутствии 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 и 0.31 мкМ бис-нетропсинов (Ia) и (II) соответственно.

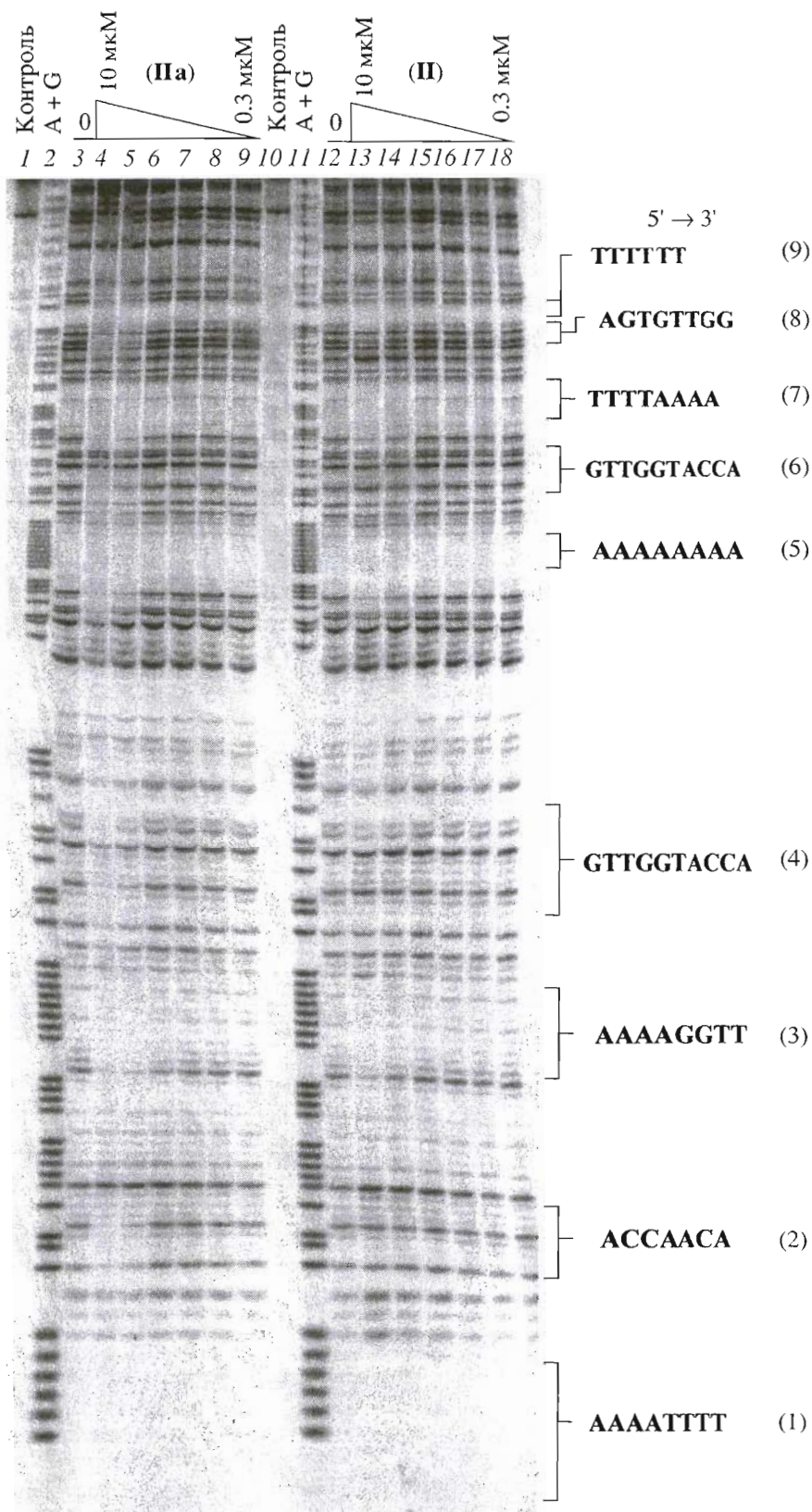


Рис. 6. Профили расщепления ДНКазой I нижней цепи ДНК-фрагмента **Б**: 1, 10 – исходный фрагмент без обработки; 2, 11 – химическое расщепление по пуринам; 3, 12 – расщепление свободного фрагмента; 4–9 и 13–18 – расщепление фрагмента в присутствии 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 и 0.31 мкМ бис-нетропсина (**Ia**) и (**Ib**) соответственно.

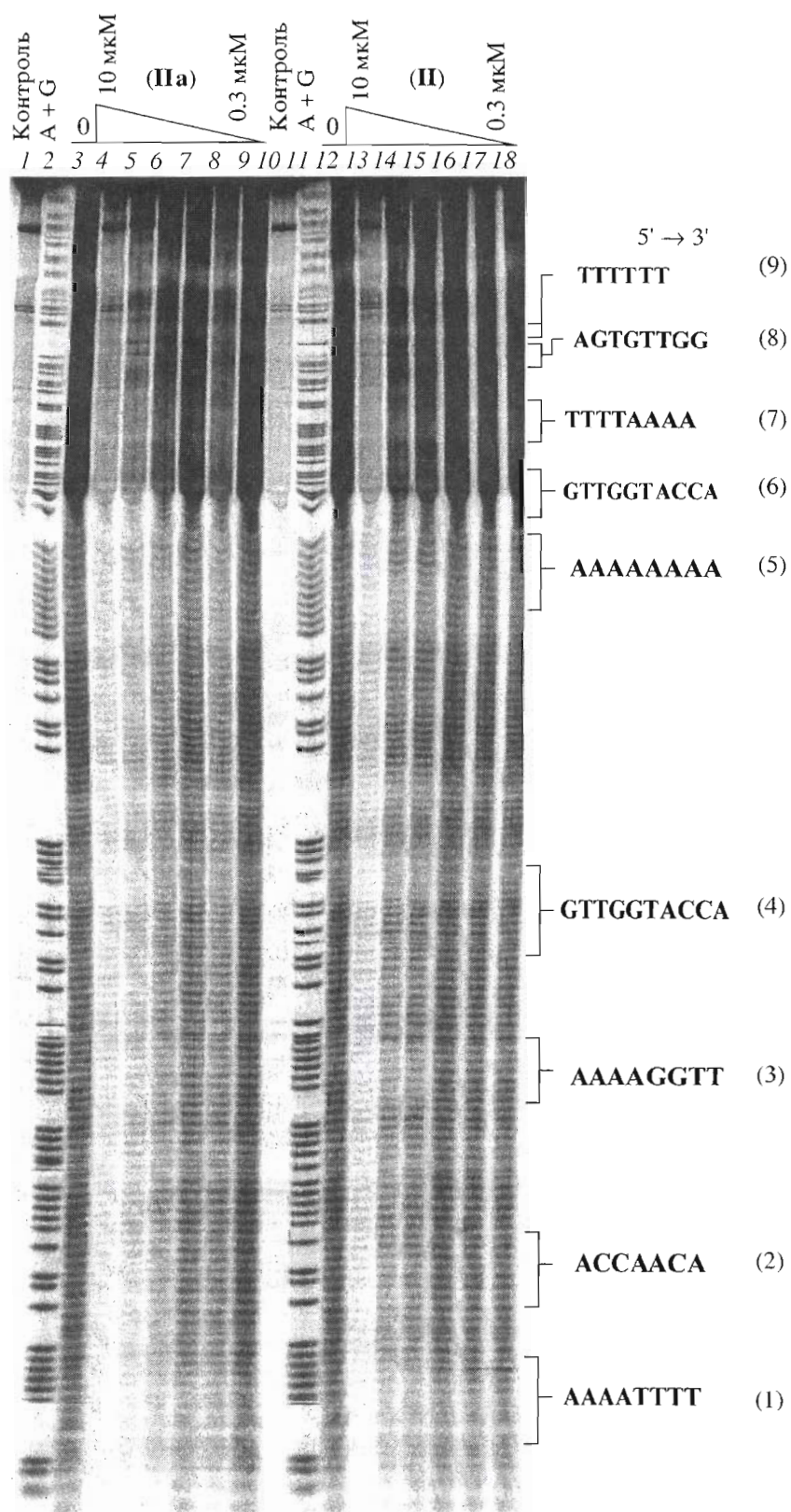


Рис. 7. Профили расщепления гидроксильными радикалами нижней цепи ДНК-фрагмента **Б**: 1, 10 – исходный фрагмент без обработки; 2, 11 – химическое расщепление по пуринам; 3, 12 – расщепление свободного фрагмента; 4–9 и 13–18 – расщепление фрагмента в присутствии 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 и 0.31 мкМ бис-нетропсинов (IIa) и (II) соответственно.

расщепления нижней цепи фрагмента **Б** гидроксильными радикалами.

Как видно из рис. 5–7, бис-нетропсин (**IIa**) с четырьмя метиленовыми звеньями, в отличие от бис-нетропсина (**II**) с пятью метиленовыми звеньями, при концентрациях 2.5–5.0 мкМ связывается, например (см. рис. 5), с последовательностями TGGTACCAAC (сайт (4)), AACSTTTT (сайт (3)) и TGTTGGT (сайт (2)) и рядом других аналогичных последовательностей. Скорее всего, связывание с такими последовательностями обусловлено образованием структур типа шпилька. Таким образом, и на фрагменте **Б** бис-нетропсин (**IIa**) проявляет более сильное защищающее от расщепления действие, чем бис-нетропсин (**II**), у которого соединительная цепочка между двумя нетропсиновыми фрагментами длиннее всего на одну метиленовую группу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы веществ в органических растворителях высушивали над Na_2SO_4 . Растворители упаривали на ротационном испарителе при 20°C в вакууме водоструйного или масляного насоса. Вещества высушивали в вакууме над P_2O_5 и NaOH . Температуры плавления определяли на приборе Voethius (Германия) и не исправляли. Гидрирование проводили над катализатором Адамса [44] при атмосферном давлении при 25°C до прекращения интенсивного поглощения водорода. Чистоту полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (Чехия) в следующих системах: $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$, 4 : 1 : 1 (А); $i\text{PrOH-конц. NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}$, 7 : 1 : 3 (Б); 1 М AcONH_4 (рН 7.6)– EtOH , 3 : 7 (В); $\text{CHCl}_3\text{-абс. EtOH}$, 95 : 5 (Г). Вещества на хроматограммах обнаруживали по поглощению при 254 нм или при проявлении нингидрином. Для колоночной хроматографии, если в методике не указаны другие условия, использовали колонку 3 × 150 см с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция) в метаноле; элюцию проводили метанолом при 4°C со скоростью 15 мл/ч, отбирали фракции объемом по 15 мл. Контроль осуществляли с помощью УФ-регистрирующего проточного денситометра Uvicord II-8300 (Швеция). Окончательную очистку соединений (**I**), (**Ia**), (**II**), (**IIa**) и проверку их индивидуальности проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке 250 × 15 мм “СКБ ИОХ АН СССР” с силикагелем С-18 (6 мкм). Для элюции использовали линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA (0–80% в течение 45 мин, скорость потока 4.8 мл/мин). ВЭЖХ проводили на хроматографе Gilson (Франция), состоящем из насосов моделей 302 и 303, манометра модели 803С, миксера 811, блока управления “Data Master-621” и УФ-детектора модели 117. Поглощение элюатов определяли при длинах волн 240 и 300 нм.

Спектры $^1\text{H-NMR}$ регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц при 33°C в $\text{DMSO-}d_6$ с Me_4Si в качестве внутреннего стандарта (δ 0.00). Химические сдвиги протонов (δ) приведены в миллионных долях. Сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, м – мультиплет. Условные обозначения пиррольных циклов (А, В) приведены на рис. 1.

Масс-спектры получены на приборе MS-50ТС (Kratos, Великобритания) при бомбардировке ускоренными атомами ксенона (матрица–глицерин) с энергией 6–8 кэВ.

Фрагменты ДНК получали расщеплением модифицированной плазмиды pGEM7(f+) (Promega), содержащей в полилинкере вставки синтетических олигонуклеотидов, рестриктазами *Xba*I и *Nsi*I (Promega) (фрагмент **А**) [28] или рестриктазами *Eco*RI и *Hind*III (Promega) (фрагмент **Б**) [16]. Для введения радиоактивной метки в 3'-конец фрагмента использовали $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dCTP}$ (фрагмент **А**) или $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ (фрагмент **Б**) (Изотоп, С.-Петербург), немеченые dNTP и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы 1 *Escherichia coli* (Boehringer Mannheim, Германия) [45]. Выделение фрагментов ДНК проводили в 5% ПААГ.

Футпринтинг с помощью гидроксильных радикалов [46]. Для приготовления комплекса 5 мкл раствора фрагмента (примерно 10^4 Бк) и немеченой ДНК плазмиды pGEM7(f+) с концентрацией 6 мкМ (в расчете на 1 п.о.) в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5) смешивали с 5 мкл раствора лиганда (концентрации указаны в подписях к рисункам) в том же буфере и охлаждали до 0°C. К смеси добавляли одновременно 5 мкл раствора, содержащего 1 мМ EDTA, 0.5 мМ соль Мора, 20 мМ аскорбат натрия, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), и 5 мкл 0.2% раствора H_2O_2 в воде и выдерживали 2 мин при 0°C.

Для остановки реакции добавляли 85 мкл раствора, содержащего 0.15 М NaCl, 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ EDTA, 10 мкг/мл тРНК. Смесь экстрагировали фенолом, ДНК осаждали этанолом, промывали 70% этанолом, высушивали, растворяли в 1 мкл 95% формамида, содержащего 15 мМ EDTA (рН 8.0), 0.05% бромфенолового синего и 0.05% ксиленианола FF, нагревали 1 мин при 90°C, быстро охлаждали и наносили на 8% денатурирующий ПААГ длиной 40 см с градиентной толщиной 0.15–0.45 мм [45, 47]. Электрофорез проводили 70 мин при 90 Вт (2.5 кВ). Перед экспонированием гель фиксировали в 10% уксусной кислоте и высушивали на стекле, предварительно обработанном γ -метакрилпропилоксианом (ЛКВ, Швеция).

Футпринтинг с помощью ДНКазы I. Для приготовления комплекса 5 мкл раствора фрагмента (примерно 10^4 Бк) и немеченой ДНК плазмиды pGEM7(f+) (Promega) с концентрацией 6 мкМ (в расчете на 1 п.о.) в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 0.1 М NaCl смешивали с 5 мкл раствора лиганда (концентрации указаны в подписях к рисункам) в

том же буфере и охлаждали до 0°C. К смеси добавляли 10 мкл раствора ДНКазы I (1 мкг/мл) (Sigma) в 10 mM Трис-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 5 mM MnCl₂ и выдерживали 2 мин при 0°C. Дальнейшая обработка проводилась аналогично предыдущей методике.

Npc—Apc—NH(CH₂)₅NH—Apc—Npc (IV). К 10.0 г (28.7 ммоль) Npc-Apc-OH (III) [23] и 28.7 ммоль CDI (Merck) добавляли 40 мл абс. DMF и смесь перемешивали в течение 30 мин при 20°C. К раствору образовавшегося имидазолида прибавляли порциями по 2 мл в час раствор 1.7 мл (14.4 ммоль) H₂N(CH₂)₅NH₂ (Merck) в 10 мл DMF. Реакционную смесь оставляли при 20°C на 70 ч, упаривали, остаток растворяли в 300 мл этилацетата и промывали 1 M HCl (3 × 100 мл), водой и насыщенным раствором NaHCO₃ (3 × 100 мл). После высушивания растворитель упаривали, остаток растворяли в 100 мл метанола и оставляли на ночь при -10°C. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом и эфиром. Выход соединения (IV) 6.5 г (59%), т. пл. 148–150°C, *R_f* 0.97 (A), 0.19 (Г). ¹H-ЯМР: 10.29 (с, 2H, ^ACONH^B), 8.23 (д, 2H, H^{5A}), 8.03 (т, 2H, CONHCH₂), 7.60 (д, 2H, H^{3A}), 7.25 (д, 2H, H^{5B}), 6.87 (д, 2H, H^{3B}), 4.40 (т, 4H, N^ACH₂), 4.25 (т, 4H, N^BCH₂), 3.19 (м, 4H, NHCH₂CH₂), 1.70 (м, 8H, CH₂CH₃), 1.48 (м, 6H, CH₂), 0.81 (м, 12H, CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 763 [*M+H*]⁺, рассчитано 762.87 (C₃₇H₅₀N₁₀O₈).

Для выделения моноацильного производного кадаверина – соединения (V) – объединенные кислотные экстракты нейтрализовали NaHCO₃, экстрагировали этилацетатом и после высушивания органической фазы добавляли 1 M раствор хлористого водорода в этилацетате. Выпавшее масло отделяли, растворяли в метаноле и вещество очищали на колонке с сефадексом LH-20. Выход соединения (V) в виде хлоргидрата 1.6 г (12%), т. пл. 214–217°C, *R_f* 0.48 (A), 0.52 (Б). ¹H-ЯМР: 10.36 (с, 2H, ^ACONH^B), 8.25 (д, 1H, H^{5A}), 8.09 (м, 1H, CONHCH₂), 7.68 (д, 1H, H^{3A}), 7.28 (д, 1H, H^{5B}), 6.93 (д, 1H, H^{3B}), 4.42 (т, 2H, N^ACH₂), 4.26 (т, 2H, N^BCH₂), 3.18 (м, 2H, NHCH₂CH₂), 2.77 (м, 2H, CH₂NH₃), 1.68 (м, 4H, CH₂CH₃), 1.42 (м, 6H, CH₂), 0.85 (т, 3H, CH₃^A), 0.82 (т, 3H, CH₃^B). Масс-спектр, *m/z*: 433 [*M+H*]⁺, рассчитано 432.52 (C₂₁H₃₂N₆O₄).

Npc—Apc—NH(CH₂)₄NH—Apc—Npc (IVa) синтезировали аналогично синтезу соединения (IV) из 10 ммоль соединения (III) и 5 ммоль путресцина (Merck) с выходом 46%, т. пл. 182–185°C, *R_f* 0.91 (A), 0.87 (Б). ¹H-ЯМР: 10.23 (с, 2H, ^ACONH^B), 8.23 (д, 2H, H^{5A}), 8.06 (т, 2H, CONHCH₂), 7.60 (д, 2H, H^{3A}), 7.25 (д, 2H, H^{5B}), 6.88 (д, 2H, H^{3B}), 4.40 (т, 4H, N^ACH₂), 4.26 (т, 4H, N^BCH₂), 3.23 (м, 4H, NHCH₂CH₂), 1.70 (м, 8H, CH₂CH₃), 1.54 (м, 4H, NHCH₂CH₂), 0.85 (т, 6H, CH₃^A), 0.81 (т, 6H, CH₃^B).

Масс-спектр, *m/z*: 749.4 [*M+H*]⁺, рассчитано 748.84 (C₃₆H₄₈N₁₀O₈).

Gly—Apc—Apc—NH(CH₂)₅NH—Apc—Apc—Gly (I). 10.0 г (13.1 ммоль) соединения (IV) гидрировали над 2 г катализатора Адамса в смеси 100 мл этанола и 10 мл 6 M водной HCl. Катализатор отфильтровывали, к раствору добавляли 8.4 мл (60 ммоль) триэтиламина и раствор упаривали. К смеси 5.3 г (30 ммоль) Вос-Gly-OH и 5.0 г CDI добавляли 20 мл абс. DMF и через 10 мин раствор имидазолида прибавляли к аминокомпоненту, выдерживали 20 ч при 20°C, добавляли 200 мл 0.5 M лимонной кислоты. Осадок отфильтровывали и дважды хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20. После упаривания фракций, содержащих соединение (I), было получено 6.4 г вещества в виде масла. Его растворяли в 50 мл TFA, выдерживали 3 ч при 25°C, упаривали и дважды хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20, а потом очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход соединения (I) в виде дитрифторацетата 4.38 г (32%), *R_f* 0.24 (A), 0.75 (Б). ¹H-ЯМР: 10.67 (с, 2H, ^ACONH^B), 9.94 (с, 2H, CH₂CONH), 8.34 (м, 6H, H₃NCH₂), 7.98 (т, 2H, NHCH₂CH₂), 7.28 (д, 2H, H^{5A}), 7.24 (д, 2H, H^{5B}), 6.97 (д, 2H, H^{3A}), 6.88 (д, 2H, H^{3B}), 4.28 (т, 8H, NCH₂), 3.72 (м, 4H, H₃NCH₂CO), 3.22 (м, 4H, NHCH₂CH₂), 1.70 (м, 8H, CH₂CH₃), 1.47 (м, 6H, NHCH₂(CH₂)₃), 0.82 (т, 12H, CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 817 [*M+H*]⁺, рассчитано 816.99 (C₄₁H₆₀N₁₂O₆).

Gly—Apc—Apc—NH(CH₂)₄NH—Apc—Apc—Gly (Ia) синтезировали по методике, аналогичной методике синтеза соединения (I) из 2.5 ммоль соединения (IVa) с выходом 24%, *R_f* 0.15 (A), 0.74 (Б). ¹H-ЯМР: 10.69 (с, 2H, ^ACONH^B), 9.92 (с, 2H, CH₂CONH), 8.24 (м, 6H, H₃NCH₂), 8.00 (т, 2H, NHCH₂CH₂), 7.27 (д, 2H, H^{5A}), 7.23 (д, 2H, H^{5B}), 6.98 (д, 2H, H^{3A}), 6.90 (д, 2H, H^{3B}), 4.27 (т, 8H, NCH₂), 3.74 (м, 4H, NH₃CH₂CO), 3.21 (м, 4H, NHCH₂CH₂), 1.68 (м, 8H, CH₂CH₃), 1.55 (м, 4H, NHCH₂(CH₂)₂), 0.80 (т, 12H, CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 803 [*M+H*]⁺, рассчитано 802.98 (C₄₀H₅₈N₁₂O₆).

Lys—Gly—Apc—Apc—NH(CH₂)₅NH—Apc—Apc—Gly—Lys (II). К смеси 0.76 г (2 ммоль) Вос-Lys(Z)-OH и 0.33 г (2 ммоль) HOBT (Fluka) в 5 мл DMF прибавляли 0.42 г (2 ммоль) DCC в 2 мл DMF и выдерживали при 20°C 30 мин. Осадок отфильтровывали и раствор прибавляли к 0.52 г (0.5 ммоль) дитрифторацетата соединения (I), оставляли при 20°C на 20 ч и раствор наносили на колонку с сефадексом LH-20. После упаривания фракций, содержащих ди-Вос, ди-Z-производное соединения (II), было получено 0.55 г вещества в виде масла. Его растворяли в смеси 3 мл TFA и 0.5 мл тиоанизола (Fluka), выдерживали 1 ч при 25°C, упаривали и дважды хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20. После упаривания фракций, содержащих ди-Z-производное соединения (II), было получено 0.51 г вещества в виде масла. Z-защитные группы удаляли

гидрированием над палладиевой чернью в метаноле, и вещество очищали на колонке с сефадексом LH-20 и затем с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход соединения (II) 0.43 г (80%), R_f 0.09 (A), 0.46 (B). Масс-спектр, m/z : 1073.6 $[M+H]^+$, рассчитано 1073.35 ($C_{53}H_{84}N_{16}O_8$).

Lys—Gly—Apc—Apc—NH(CH₂)₄NH—Apc—Apc—Gly—Lys (IIa) синтезировали по методике синтеза соединения (II) из 1 ммоль соединения (Ia) с выходом 67%. Масс-спектр, m/z : 1059.6 $[M+H]^+$, рассчитано 1059.32 ($C_{52}H_{82}N_{16}O_8$).

Npc—NH(CH₂)₅NH—Npc (VI). 20.0 г (101 ммоль) 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты [3] кипятили с обратным холодильником со смесью 50 мл $SOCl_2$ и 0.05 мл DMF 40 мин, раствор упаривали, остаток несколько раз упаривали с бензолом и растворяли в 150 мл этанола. К раствору добавляли 5.9 мл (50 ммоль) $H_2N(CH_2)_5NH_2$ и затем по каплям при интенсивном перемешивании 15 мл (104 ммоль) триэтиламина. Через 2 ч реакционную смесь охлаждали до 0°C, осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из этанола. Выход соединения (VI) 20.9 г (89%), т. пл. 204–206°C, R_f 0.94 (B), 0.82 (Г). ¹H-ЯМР: 8.29 (т, 2H, CONH), 8.06 (д, 2H, H₅), 7.34 (д, 2H, H₃), 4.31 (т, 4H, NCH₂), 3.18 (м, 4H, CONHCH₂), 1.87–1.28 (м, 10H, CH₂), 0.80 (т, 6H, CH₃). Масс-спектр, m/z : 462.5 $[M+H]^+$, рассчитано 462.50 ($C_{21}H_{30}N_6O_6$).

Npc—NH(CH₂)₄NH—Npc (VIa) синтезировали по методике синтеза соединения (VI) с выходом 76%, т. пл. 217–220°C, R_f 0.93 (B), 0.74 (Г). ¹H-ЯМР: 8.34 (т, 2H, CONH), 8.09 (д, 2H, H₅), 7.36 (д, 2H, H₃), 4.32 (т, 4H, NCH₂), 3.20 (м, 4H, CONHCH₂), 1.8–1.4 (м, 8H, CH₂), 0.79 (т, 6H, CH₃). Масс-спектр, m/z : 449 $[M+H]^+$, рассчитано 448.47 ($C_{20}H_{28}N_6O_6$).

Z-Gly-Apc-OH (VII). К раствору 13.4 г (65.3 ммоль) хлоргидрата 4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты [23] в 100 мл DMF добавляли 18.4 мл (131 ммоль) триэтиламина и раствор имидазолида, приготовленный при растворении 13.6 г (65 ммоль) Z-Gly-OH (Reanal) и 11.1 г (65 ммоль) CDI в 30 мл DMF и выдерживании в течение 10 мин. Раствор оставляли при 20°C на 48 ч, упаривали, растворяли в 300 мл воды и добавляли конц. HCl до pH 2. Выпавшее масло растворяли в 1 л этилацетата, промывали 1 M HCl (4 × 200 мл), водой и высушивали. Раствор упаривали до 70 мл, охлаждали до 0°C, осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом и эфиром. Выход соединения (VII) 18.8 г (80%), т. пл. 153–154°C, R_f 0.96 (A), 0.37 (Г). ¹H-ЯМР: 9.78 (с, 1H, CH₂CONH), 7.43 (т, 1H, CONHCH₂), 7.31 (с, 5H, C₆H₅), 7.28 (д, 1H, H₅), 6.71 (д, 1H, H₃), 5.03 (с, 2H, C₆H₅CH₂), 4.19 (т, 2H, NCH₂), 3.74 (м, 2H, NHCH₂CO), 1.66 (м, 2H,

CH₂CH₃), 0.80 (т, 3H, CH₃). Масс-спектр, m/z : 360 $[M+H]^+$, рассчитано 359.38 ($C_{18}H_{21}N_3O_5$).

Z-Gly—Apc—Apc—NH(CH₂)₅NH—Apc—Apc—Gly-Z (VIII). К раствору 6.47 г (18 ммоль) соединения (VII) и 2.57 г (19 ммоль) HOBT в 20 мл DMF добавляли раствор 3.81 г (18.5 ммоль) DCC в 10 мл DMF, выдерживали при 20°C 1.5 ч, осадок отфильтровывали и фильтрат добавляли к раствору аминокомпонента в смеси 30 мл DMF и 8.4 мл (60 ммоль) триэтиламина. Аминокомпонент получали гидрированием 4.1 г (8.9 ммоль) соединения (VI) над 1.0 г катализатора Адамса в смеси 100 мл этанола и 10 мл 6 M HCl с последующим отфильтровыванием катализатора и упариванием раствора. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 20°C, осадок отфильтровывали, раствор упаривали, остаток растворяли в 300 мл хлороформа, промывали 1 M HCl, водой, 9% NaHCO₃ (2 × 100 мл) и высушивали. Раствор упаривали, остаток растворяли в 150 мл этанола и оставляли на несколько дней при 0°C. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этанолом и эфиром. Выход соединения (VIII) 5.5 г (57%), т. пл. 175–178°C, R_f 0.89 (A), 0.53 (Г). ¹H-ЯМР: 10.71 (с, 2H, ^ΔCONH^B), 9.76 (с, 2H, CH₂CONH^A), 7.91 (т, 2H, OCONH), 7.31 (с, 10H, C₆H₅), 7.15 (м, 4H, H₅^{A,B}), 6.85 (д, 2H, H₃^A), 6.80 (д, 2H, H₃^B), 5.04 (с, 4H, C₆H₅CH₂), 4.20 (т, 8H, NCH₂), 3.76 (д, 4H, NHCH₂CO), 1.79–1.33 (м, 14H, CH₂CH₃ + NHCH₂CH₂CH₂CH₂), 0.79 (т, 12H, CH₃). Масс-спектр, m/z : 1085 $[M+H]^+$, рассчитано 1085.28 ($C_{57}H_{72}N_{12}O_{10}$).

Z-Gly—Apc—Apc—NH(CH₂)₄NH—Apc—Apc—Gly-Z (VIIIa) синтезировали по методике синтеза соединения (VIII) из 2 ммоль соединения (VIa). Выход соединения (VIIIa) 1.8 г (83%), R_f 0.85 (A), 0.47 (Г).

После удаления из соединений (VIII) и (VIIIa) Z-групп гидрированием над Pd-чернью были получены соединения (I) и (Ia), по своим характеристикам аналогичные соединениям (I) и (Ia), полученным по схеме 1.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 01-03-32669, 01-04-48657 и 00-04-48240).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев В.А., Суrowая А.Н., Сидорова Н.Ю., Гроховский С.Л., Заседателев А.С., Гурский Г.В., Жузе А.Л. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 192–210.
2. Zimmer Ch., Wahnert U. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1986. V. 47. P. 31–112.
3. Гроховский С.Л., Жузе А.Л., Готтх Б.П. // Био-орган. химия. 1975. Т. 1. С. 1616–1623.
4. Заседателев А.С., Жузе А.Л., Циммер К., Гроховский С.Л., Туманян В.Г., Гурский Г.В., Гот-

- мих Б.П. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. С. 1006–1009.
5. Luck G., Zimmer Ch., Reinert K.-E., Arcamone F. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. P. 2655–2670.
 6. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Surovaya A.N., Nikitin S.M., Krylov A.S., Retchinsky V.O., Mikhailov M.V., Beabekashvili R.S., Gottikh B.P. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
 7. Dervan P.B. // Science. 1986. V. 232. P. 464–471.
 8. Гроховский С.Л., Никитин С.М., Хорлин А.А., Жузе А.Л., Крылов А.С., Михайлов М.В., Заседателев А.С., Гурский Г.В., Готтих Б.П. Механизмы биосинтеза антибиотиков. М.: Наука, 1986. С. 202–217.
 9. Lown J.W. // Anti-Cancer Drug Design. 1988. V. 3. P. 25–40.
 10. Arcamone F.M., Animati F., Barbieri B., Conflicchi E., D'Alessio R., Geroni C., Giuliani F.C., Lazzari E., Menozzi M., Penco S., Verini M.A. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. P. 774–778.
 11. Хорлин А.А., Гроховский С.Л., Жузе А.Л., Готтих Б.П. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 1063–1069.
 12. Khorlin A.A., Krylov A.S., Grokhovsky S.L., Zhuze A.L., Zasedatelev A.S., Gursky G.V., Gottikh B.P. // FEBS Lett. 1980. V. 118. P. 311–314.
 13. Речинский В.О., Бибилашвили Р.Ш., Хорлин А.А., Гроховский С.Л., Крылов А.С., Заседателев А.С., Жузе А.Л., Гурский Г.В., Готтих Б.П. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. С. 244–247.
 14. Скамров А.В., Рыбалкин И.Н., Бибилашвили Р.Ш., Готтих Б.П., Гроховский С.Л., Гурский Г.В., Жузе А.Л., Заседателев А.С., Нечипуренко Ю.Д., Хорлин А.А. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 177–195.
 15. Станчев Б.С., Гроховский С.Л., Хорлин А.А., Готтих Б.П., Жузе А.Л., Скамров А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С. 1614–1624.
 16. Sukhanova A., Grokhovsky S., Zhuze A., Roper D., Bronstein I. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 44. P. 997–1010.
 17. Schultz P.G., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 7748–7750.
 18. Lown J.W., Krowicki K., Balzarini J., Newman R.A., De Clercq E. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. P. 2368–2375.
 19. Wyatt M.D., Garbiras B.J., Lee M., Forrow S.M., Hartley J.A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994. V. 4. P. 801–806.
 20. White S., Szewczyk J.W., Turner J.M., Baird E.E., Dervan P.B. // Nature. 1998. V. 391. P. 468–471.
 21. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D.S., Pjura P., Dickerson R.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 1376–1380.
 22. Coll M., Frederick C.A., Wang A.H.-J. H., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 8385–8389.
 23. Гроховский С.Л., Готтих Б.П., Жузе А.Л. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 570–583.
 24. Patel D.J., Shapiro L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 1230–1240.
 25. Portugal J., Waring M.J. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 167. P. 281–289.
 26. Ward B., Rehfuess R., Goodisman J., Dabrowiak J.C. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1198–1205.
 27. Abu-Daya A., Fox K.R. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4962–4969.
 28. Grokhovsky S.L., Surovaya A.N., Burckhardt G., Pismensky V.F., Chernov B.K., Zimmer Ch., Gursky G.V. // FEBS Lett. 1998. V. 439. P. 346–350.
 29. Brown P.M., Fox K.R. // J. Mol. Biol. 1996. V. 262. P. 671–685.
 30. Sanghani S.R., Zakrzewska K., Harvey S.C., Lavery R. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 1632–1637.
 31. Coll M., Aymami J., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang A.H.-J. // Biochemistry. 1989. V. 88. P. 310–320.
 32. Price M.A., Tullius T.D. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 127–136.
 33. Pelton J.G., Wemmer D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 5723–5727.
 34. Wemmer D.E., Geierstanger B.H., Fagan P.A., Dwyer T.J., Jacobsen J.P., Pelton J.G., Ball G.E., Lehnen A.R., Chang W.-H., Bathini Y., Lown J.W., Rentzperis D., Marky L.A., Singh S., Kollman P. // Structural Biology: The State of the Art / Eds R.H. Sarma, M.H. Sarma. New York: Adenine Press, 1994. P. 301–323.
 35. Taylor J.S., Schultz P.G., Dervan P.B. // Tetrahedron. 1984. V. 40. P. 457–465.
 36. Гроховский С.Л., Николаев В.А., Зубарев В.Е., Суровая А.Н., Жузе А.Л., Чернов Б.К., Сидорова Н.Ю., Заседателев А.С., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1274–1297.
 37. Spielmann H.P., Fagan P.A., Bregant T.M., Little R.D., Wemmer D.E. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1576–1583.
 38. Hagerman P.J. // Nature. 1986. V. 321. P. 449–450.
 39. Sproul D., Young M.A., Beveridge D.L. // J. Mol. Biol. 1999. V. 285. P. 1623–1632.
 40. Grokhovsky S.L., Zubarev V.E. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 257–264.
 41. 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.
 42. Surovaya A.N., Burckhardt G., Grokhovsky S.L., Birch-Hirschfeld E., Gursky G.V., Zimmer Ch. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. V. 14. P. 595–606.
 43. Surovaya A.N., Burckhardt G., Grokhovsky S.L., Birch-Hirschfeld E., Nikitin A.M., Fritzsche H., Zimmer Ch., Gursky G.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2001. V. 18. P. 689–701.
 44. Синтезы органических препаратов. М.: ИЛ, 1953. Т. 4. С. 46–47.
 45. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
 46. Dixon W.J., Hayes J.J., Levin J.R., Weidner M.F., Dombroski B.A., Tullius T.D. // Methods Enzymol. 1991. V. 208. P. 380–413.
 47. Краев А.С. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. С. 1164–1197.

DNA Sequence-specific Ligands. XI. The Synthesis and Binding to DNA of bis-Netropsins with the C-Ends of Their Netropsin Fragments Tethered by Tetra- or Pentamethylene Linkers

S. L. Grokhovsky*,**#, V. A. Nikolaev*, B. P. Gottikh*, and A. L. Zhuze*

Phone: +7 (095) 135-9718; fax: +7 (095) 135-1405; e-mail: grokhovs@imb.ac.ru

* Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

** Moscow Center of Medical Research of Oslo University, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119991 Russia

Bis-Netropsins with the C-ends of their netropsin fragments tethered via tetra- or pentamethylene linkers and with Gly or L-Lys-Gly residues on their N-ends were synthesized. The footprinting technique was used to study the specificity of bis-netropsin binding to the specially constructed DNA fragments containing various clusters of A · T pairs. It was found that the linker length affects the binding of bis-netropsins, with the tetramethylene linker providing better protection than the pentamethylene linker. It was shown that the newly synthesized bis-netropsins bind tighter to the 5'-A₄T₄-3' sequence, whereas the bis-netropsin with a linker between the netropsin N-ends binds better to 5'-T₄A₄-3' sequences. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: bis-netropsins, chemical synthesis, distamycin A, DNA sequence-specific ligands, footprinting, netropsin