



УДК 547.963.3:577.113.6.088.53: 543.422.25

СТАБИЛИЗАЦИЯ G•C-СОДЕРЖАЩИХ ДНК-ДУПЛЕКСОВ ПОЛИАМИДАМИ С ПАРАЛЛЕЛЬНОЙ ОРИЕНТАЦИЕЙ В МАЛОЙ БОРОЗДКЕ

© 2004 г. А. Н. Синяков*, А. С. Буторин**, К. Элен**, В. А. Рябинин****

*Институт молекулярной биологии, ГНЦ ВБ "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

**Музей естественной истории, Париж, Франция;

***Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, Россия

Поступило в редакцию 13.04.2004 г. Принято к печати 21.05.2004 г.

Работа посвящена полиамам на основе 4-амино-1-метилпиррол-2-карбоновой кислоты, 4-амино-1-метилимидазол-2-карбоновой кислоты и β-аланина, стабилизирующим олигонуклеотидный дуплекс, состоящий из G•C-пар, за счет укладки в малую бороздку в параллельной ориентации. Дуплекс TTGCGCp•GCGCAA плавится при 28°C. Дуплекс TTGCGCp[NH(CH₂)₃COPyImβImNH(CH₂)₃NH(CH₂)₂][NH(CH₂)₃COImβImPyNH(CH₂)₃N(CH₃)₂]•GCGCAA (бисфосфамид с параллельной ориентацией лигандов, где Py, Im, β – остатки 1-метил-4-аминопиррол-2-карбоновой, 1-метил-4-аминоимидазол-2-карбоновой кислот и β-аланина соответственно) плавится при 48°C и дуплекс TTGCGCp[NH(CH₂)₃COImβImPyNH(CH₂)₃COImβImPyNH(CH₂)₃N(CH₃)₂]•GCGCAA (шпилечная структура с антипараллельной ориентацией) при 56°C.

Ключевые слова: ДНК, лиганды малой бороздки; олигонуклеотиды, конъюгаты; дистамицин; полиамиды, сиквенспецифичные.

Конъюгаты малобороздочных лигандов с олигонуклеотидами представляют большой интерес при создании молекул, обладающих повышенной сайт-специфичностью. В частности, данный подход может оказаться полезным при дизайне праймеров и олигонуклеотидных зондов. Ранее нами было показано, что лиганды малой бороздки, присоединенные к концевой фосфатной группе, в комплексе со-

става 2 : 1 (бисфосфамиды) способны укладываться в малую бороздку в параллельной ориентации и стабилизировать олигонуклеотидный дуплекс аналогично шпилечным лигандам с антипараллельной ориентацией олигокарбоксамидных фрагментов. Это было продемонстрировано на примере А•Т-дуплексов, стабилизированных олигопирролкарбоксамидами [1, 2]. В нашей работе показана воз-

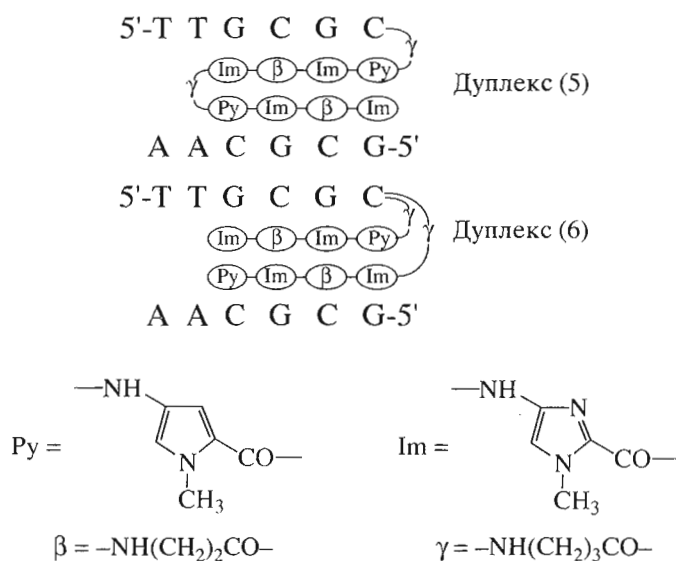
Температуры плавления дуплексов TTGCGCpX¹X²•GCGCAA

Дуплекс	X ¹	X ²	T _{пл} , °C
(1)	–	–	28
(2)	~NH(CH ₂) ₃ COPyImPyImNH(CH ₂) ₃ COPyImPyImNH-(CH ₂) ₃ NMe ₂	–	28
(3)	~NH(CH ₂) ₃ COImPyImPyNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	~NH(CH ₂) ₃ COPyImPyImNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	26
(4)	~NH(CH ₂) ₃ COImPyImPyNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	ВосNH(CH ₂) ₃ COImPyImPyNH(CH ₂) ₃ NH~	30
(5)	–	~NH(CH ₂) ₃ COImβImPyNH(CH ₂) ₃ COImβImPyNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	56
(6)	~NH(CH ₂) ₃ COImβImPyNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	~NH(CH ₂) ₃ COPyImβImNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	48
(7)	~NH(CH ₂) ₃ COImβImPyNH(CH ₂) ₃ NMe ₂	ВосNH(CH ₂) ₃ COImβImPyNH(CH ₂) ₃ NH~	50

Сокращения: MGB – малобороздочный лиганд; Py, Im, γ, β – остатки 1-метил-4-аминопиррол-2-карбоновой, 1-метил-4-аминоимидазол-2-карбоновой, γ-аминоасляной кислот и β-аланина соответственно.

Структуры обоих олигонуклеотидов дуплексов написаны в направлении от 5'- к 3'-концу.

Автор для переписки (тел.: (3832) 30-46-53, эл. почта: ryabinin@niboch.nsc.ru).



возможность использования данного подхода для стабилизации G•C-содержащих дуплексов.

В качестве модельного был выбран олигонуклеотид TTGCGCp, несущий на 3'-конце фосфатную группу, к которой, согласно работам [1, 2], присоединялись малобороздочные лиганды (получены по методике [3]). Стабилизирующий эффект конъюгированных лигандов определялся по изменению температуры плавления дуплекса, образованного конъюгатом и комплементарным ему олигонуклеотидом GCGCAA. Попытка повысить стабильность дуплекса (1) (таблица) с помощью шпилечного лиганда (антипараллельная укладка), состоящего только из пиррольных и имидазольных фрагментов в соответствии с правилом [4], по которому G•C-паре соответствует пара ImPy, оказалась безуспешной – значение $T_{пл}$ дуплекса (2) не отличается от такового для исходного дуплекса (1). Аналогичная картина наблюдалась и для бисфосфамидов как с параллельной, так и с антипараллельной ориентацией тетракарбоксамидных фрагментов (дуплексы (3) и (4)). Такого рода эффект описан ранее [5] и обусловлен несоответствием кривизны молекулы MGB и малой бороздки олигонуклеотидного дуплекса. По данным работы [5], изменение жесткости и соответственно кривизны лиганда и его способности встраиваться в малую бороздку достигается за счет замены в паре ImPy пирролкарбоксамидного остатка на остаток β -аланина (β). Использование такого подхода позволило нам увеличить константу связывания лиганда с G•C-трактом олигонуклеотида. Это продемонстрировано на примере дуплекса (5), когда замена одного пиррольного остатка на остаток β -аланина в каждом из тетракарбоксамидных фрагментов в шпилечном лиганде приводит к повышению значения $T_{пл}$ на 28°C. Сконструированный таким же образом бисфосфамид с параллельной

ориентацией тетракарбоксамидных звеньев имеет $T_{пл}$ 48°C (дуплекс (6)), на 8°C меньше, чем для дуплекса (5). Следует отметить, что значение $T_{пл}$ дуплекса для бисфосфамида, в котором тетракарбоксамидные остатки расположены антипараллельным образом (дуплекс (7)), также меньше, чем у дуплекса (5) ($T_{пл} = 50^\circ\text{C}$). Поэтому можно предположить, что в данном случае на стабильности дуплекса сказывается не параллельный или антипараллельный способ укладки лиганда, а различия в расположении друг относительно друга тетракарбоксамидных остатков в малой бороздке. Видимо, используя различные по протяженности линкеры в бисфосфамидах (например, один из линкеров остаток аминокислотной, а второй аминокпроновой кислоты) можно повысить стабилизирующий эффект бисфосфамидов с параллельным расположением лигандов.

Данные о стабилизации A•T- и G•C-содержащих дуплексов бисфосфамидами дают основание полагать, что аналогично шпилечным лигандам, предложенным в работе [6], возможно создание бисфосфамидов с параллельной ориентацией олигокарбоксамидных фрагментов, способных связываться сиквенспецифичным образом с желаемой олигонуклеотидной последовательностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке European Community (грант INTAS 01-0638), French Ministry of Foreign Affairs (грант EGIDE 04542ND), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 04.70043-69), индивидуальных грантов Centre National de la Recherche Scientifique, Франция (“poste rouge” для А.Н. Синякова) и Музея естественной истории, Париж, Франция (для В.А. Рябинина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябинин В.А., Денисов А.Ю., Пышный Д.В., Абрамова Т.В., Синяков А.Н., Власов В.В. // Докл. АН. 1999. Т. 368. С. 836–838.
2. Синяков А.Н., Рябинин В.А., Гримм Г.Н., Буторин А.С. // Мол. биология. 2001. Т. 35. С. 298–308.
3. Рябинин В.А., Феценко М.В., Синяков А.Н. // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. С. 449–451.
4. White S., Szweczyk W., Turner J.M., Baird E.E. // Nature. 1998. V. 391. P. 468–471.
5. Turner J.M., Swalley S.E., Baird E.E., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 6219–6226.
6. Dervan P.B., Edelson B.S. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. V. 13. P. 284–299.

Stabilization of G•C-Containing DNA Duplexes by Polyamides with Parallel Orientation in the Minor Groove

A. N. Sinyakov*, A. S. Boutorine**, C. Hélène**, and V. A. Ryabinin****

Phone: +7 (3832) 30-4653; e-mail: ryabinin@niboch.nsc.ru

*Institute of Molecular Biology, Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

**Laboratoire de Biophysique, INSERM U565 - CNRS UMR 8646,

Museum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

***Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, Russia

The polyamides based on 4-amino-1-methylpyrrol-2-carboxylic acid, 4-amino-1-methylimidazole-2-carboxylic acid, and β -alanine that stabilize oligonucleotide duplexes consisting of G•C pairs through parallel packing in the minor groove were studied. The initial duplex TTGCGCp•GCGCAA melts at 28°C; the TTGCGCp[NH(CH₂)₃COPyIm β ImNH(CH₂)₃NH(CH₂)₂][NH(CH₂)₃COIm β ImPyNH(CH₂)₃N(CH₂)₂]•GCGCAA duplex (bisphosphoramidate with parallel orientation of ligands, where Py, Im, and β are the residues of 1-methyl-4-aminopyrrol-2-carboxylic and 1-methyl-4-aminoimidazole-2-carboxylic acids and β -alanine, respectively), at 48°C; and the TTGCGCp[NH(CH₂)₃COIm β ImPyNH(CH₂)₃COIm β ImPyNH(CH₂)₃N(CH₂)₂]•GCGCAA duplex (a hairpin structure with antiparallel orientation), at 56°C. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: conjugates of oligonucleotides, distamycin, minor groove DNA binders, sequence-specific polyamides

Сдано в набор 28.05.2004 г.

Подписано к печати 02.08.2004 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 14.0

Усл. кр.-отт. 3.6 тыс.

Уч.-изд. л. 13.9

Бум. л. 7.0

Тираж 265 экз.

Зак. 8591

Учредители: Российская академия наук,
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Адрес издателя: 117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6