



УДК 547.963.32:577.113.4

КОНЬЮГАТ ВОДИРУ И ТРИМЕТИЛМЕЛАМИНА
ДЛЯ ПОПЕРЕЧНОЙ СШИВКИ ДНК *in vitro*© 2011 г. В. А. Ефимов, С. В. Федюнин, О. Г. Чахмахчева[#]Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 01.09.2010 г. Принято к печати 03.11.2010 г.

Получен конъюгат флуоресцентного красителя 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-пропионовой кислоты (ВОДИРУ) и *N*²,*N*⁴,*N*⁶-триметилмеламина. Показано, что в присутствии формальдегида это соединение образует поперечные ковалентные сшивки цепей ДНК *in vitro*.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, поперечная сшивка, кросс-сшивающие агенты, гексаметилмеламин, триметилмеламин, тримеламол, ВОДИРУ.

Сшивки между цепями нуклеиновых кислот (НК) в живых клетках могут вызываться действием как вносимых извне химических реагентов, так и эндогенно образующихся соединений. Имея разную химическую природу, все они функционируют, в основном, как алкилирующие или арилирующие реагенты. В настоящее время кросс-сшивающие реагенты используются как противоопухолевые препараты и инструменты для исследования особенностей биологического поведения поперечно сшитых дуплексов НК [1].

Способностью сшивать две цепи ДНК обладают некоторые производные *s*-триазина, в частности, ярко выраженной противоопухолевой активностью обладает гексаметилмеламин (НММ, (I)) (рис. 1а), эффективный против метастазирующих форм рака груди, лимфомы, рака легких и некоторых других онкологических заболеваний [2]. Точный механизм его действия до сих пор неизвестен. Предполагается, что НММ активируется в организме в результате окисления цитохромом Р-450 с образованием

N-(гидроксиметил)-интермедиатов (Iа) (рис. 1а) [3] и после дегидратации образует активный иминиевый ион (Iб), являющийся потенциальным электрофилом и, по-видимому, активной частицей, ответственной за алкилирование ДНК. Далее аналогичный фрагмент образуется в другой части молекулы, и в конечном итоге происходит образование кросс-сшитой ДНК.

Клинические испытания НММ выявили ряд недостатков при его пероральном применении, связанных с различной способностью организмов разных пациентов образовывать активные *N*-гидроксиметильные метаболиты [4]. В качестве альтернативы НММ для внутривенного введения была предложена его биоактивированная форма – 2,4,6-трис[(гидроксиметил)метиламино]-1,3,5-триазин (тримеламол, ТМ, (II)) (рис. 1б) [3, 5]. ТМ легко получается из *N*²,*N*⁴,*N*⁶-триметилмеламина (триметилмеламин, ТММ, (III)) при обработке последнего формальдегидом [6, 7] (схема 1). ТМ хорошо растворим в воде, не требует активации окислением и действует аналогично НММ, являясь эффективным реагентом, образующим кросс-сшивки ДНК. Однако, в отличие от НММ, ТМ нестабилен в водных растворах (при комнатной температуре его период полураспада составляет около 200 мин при рН 7.4).

Сокращения: ISC – поперечная сшивка цепей ДНК; ВОДИРУ – 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-пропионовая кислота; НММ – гексаметилмеламин; ТМ – тримеламол; ТММ – *N*²,*N*⁴,*N*⁶-триметилмеламин; ТММВ – конъюгат ВОДИРУ и *N*²,*N*⁴,*N*⁶-триметилмеламина.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 336-59-11, эл. почта: eva@mx.ibch.ru).

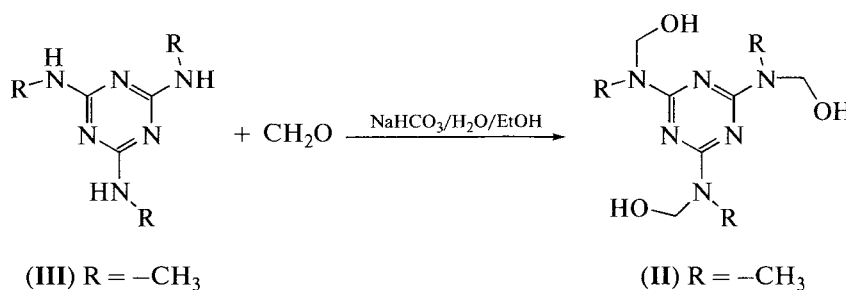


Схема 1. Синтез ТМ из ТММ. Реакцию проводили с 4-кратным мольным избытком формальдегида, в смеси этанол–вода (4 : 1), содержащей 0.25 М NaHCO_3 , при 25°C в течение 24 ч. Выход ТМ составил 54%.

Способ действия ТМ и предпочтительные участки в ДНК для его связывания точно не установлены. Был постулирован механизм, основанный на катализируемом кислотой элиминировании воды с образованием реакционноспособного электрофильного иона (IIa) (рис. 1б). Другой предложенный механизм образования ISC под действием ТМ предполагает не ковалентное присоединение этого реагента к цепям ДНК, а кросс-сшивки цепей ДНК под действием формальдегида, являющегося продуктом деформилирования ТМ [8].

Исследование возможности протекания того или другого процесса показало, что в присутствии тиофенола ТМ образует исключительно тризамещенный тиоэфирный аддукт, при этом аддукты деформилирования, так же как и соединенные метиленовым мостиком бистиофенольные продукты, обнаружены не были [5], что свидетельствовало не в пользу второго механизма. Далее проводился анализ кросс-сшитой при действии ТМ линейной формы $5\text{-}^{32}\text{P}$ -меченной плазмидной ДНК pBR322 с помощью электрофореза в агарозном геле. Анализ основывался на том, что после полной денатурации цепей плазмидной ДНК наличие кросс-сшивки будет заметно по присутствию на геле полос, соответствующих двухцепочечной ДНК. Было показано, что сшивки начинали образовываться уже при концентрациях ТМ, порядка 2.5–5.0 пМ, и степень их образования повышалась с увеличением концентрации ТМ. Такой уровень сшивающей активности сопоставим с активностью алкилирующих агентов на основе азотистых ипритов [5]. Еще одним косвенным подтверждением механизма, показанного на рис. 1б, являлся тот факт, что при понижении рН от 7.0 повышалась эффективность сшивки, а при рН 4.0 ее скорость возрастала в 10 раз по сравнению с нейтральным рН. В то же время обработка линейной формы pBR322 формальдегидом в различных концентрациях не приводила к образованию кросс-сшивок ДНК. Таким образом эти результаты, полу-

ченные *in vitro*, показывали, что формальдегид сам по себе не дает кросс-сшивок ДНК [5].

Ранее было также высказано предположение, что происходящие в месте сшивки два акта алкилирования по разным цепям ДНК, приводящие к образованию ISC, происходят очень быстро одно за другим, практически одновременно. Так, реакция алкилирования второй цепи (обычно лимитирующая скорость сшивки в случае многих реагентов) протекает настолько быстро, что ее скорость не удалось измерить [8]. Предполагается, что после интеркаляции в ДНК и алкилирования одной из ее цепей с участием первой имминиевой группировки ТМ, другая активированная имминиевая группировка, находясь в непосредственной близости ко второй цепи ДНК, осуществляет ее практически немедленное алкилирование, и при этом, предположительно, происходит небольшое изменение конформации дуплекса [8].

В ходе сравнения эффективности образования поперечных сшивок ДНК *in vitro* под действием ряда интеркалирующих кросс-сшивающих реагентов мы исследовали взаимодействие двухцепочечных фрагментов ДНК с ТМ с целью дальнейшего изучения механизма действия этого реагента при образовании сшивок. В качестве фрагментов ДНК использовали дуплексы длиной около 30 п.о., образованные синтетическими олигонуклеотидами. Кросс-сшивки проводили в растворе 20–30 мкМ олигонуклеотидных дуплексов с концентрацией 20–30 мкМ в 0.03 М буфере триэтанолламин–HCl (рН 5.0) с использованием 50–500 мкМ концентраций ТМ, полученного из ТММ как показано на схеме 1 [7, 9], в течение 3–5 ч при комнатной температуре. Для обнаружения поперечной сшивки в дуплексе, а также для оценки эффективности этого процесса проводился гелеэлектрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях по методу К. Джексона и др. [8]. При этом сшитые дуплексы легко обнаруживались по наличию полос с меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с одонитчатыми олигонуклеотидами.

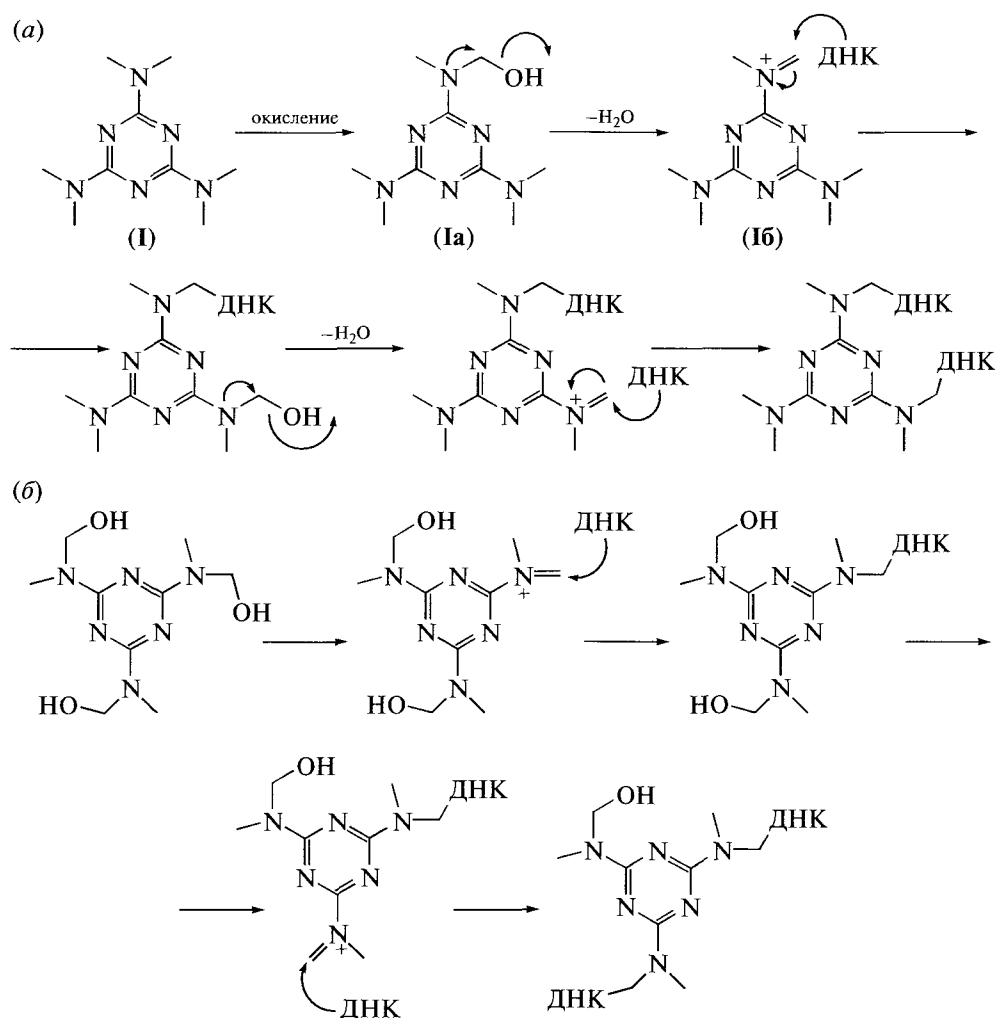


Рис. 1. Окислительная активация гексаметилмеламина (а) и гипотетический механизм образования поперечной сшивки цепей ДНК-дуплексов (б).

Было найдено, что выход сшитых дуплексов возрастал с увеличением концентрации ТМ, не превышая, тем не менее, 10%. Увеличение времени реакции не давало заметного эффекта, по-видимому, вследствие деградации ТМ в воде, тогда как повторное добавление дополнительного количества кросс-сшивающего реагента через 3 ч после начала реакции приводило к некоторому повышению выхода сшитой ДНК.

Для увеличения выхода кросс-сшивок мы использовали смесь триметилмеламина (ТММ, (III)) и формальдегида. ТММ получали как описано С. Рамурти и М. Миллером [7] и использовали для сшивок в концентрации от 50 до 500 мкМ в смеси с 150–1500 мкМ формальдегидом. При прибавлении формальдегида к ТММ происходило образование ТМ *in situ*. С использованием этого подхода выход сшитой ДНК возрос практически в 5 раз. Параллельно в контрольных экспериментах двухцепочечная ДНК

подвергалась в тех же условиях обработке только одним формальдегидом или только одним ТММ. В обоих последних случаях не наблюдалось образования ISC ДНК.

Для дальнейшего доказательства присутствия остатка молекулы тримеламола в сшитой ДНК мы синтезировали производное ТММ, в котором одна из CH_3 -функций была заменена флуоресцентной меткой. В качестве флуоресцентного красителя для конъюгирования с ТММ был выбран один из самых чувствительных нейтральных красителей BODIPY. Синтез производного N^2, N^4, N^6 -триметилмеламина, меченного BODIPY (ТММВ), осуществляли как показано на схеме 2. В качестве мостика между остатками красителя и ТММ в молекулу триазина был введен гибкий гексаметилдиаминовый линкер, в результате чего был получен 2-*N*-(6-аминогексил)амино-4,6-ди-*N*-метиламино-*s*-триазин (IV).

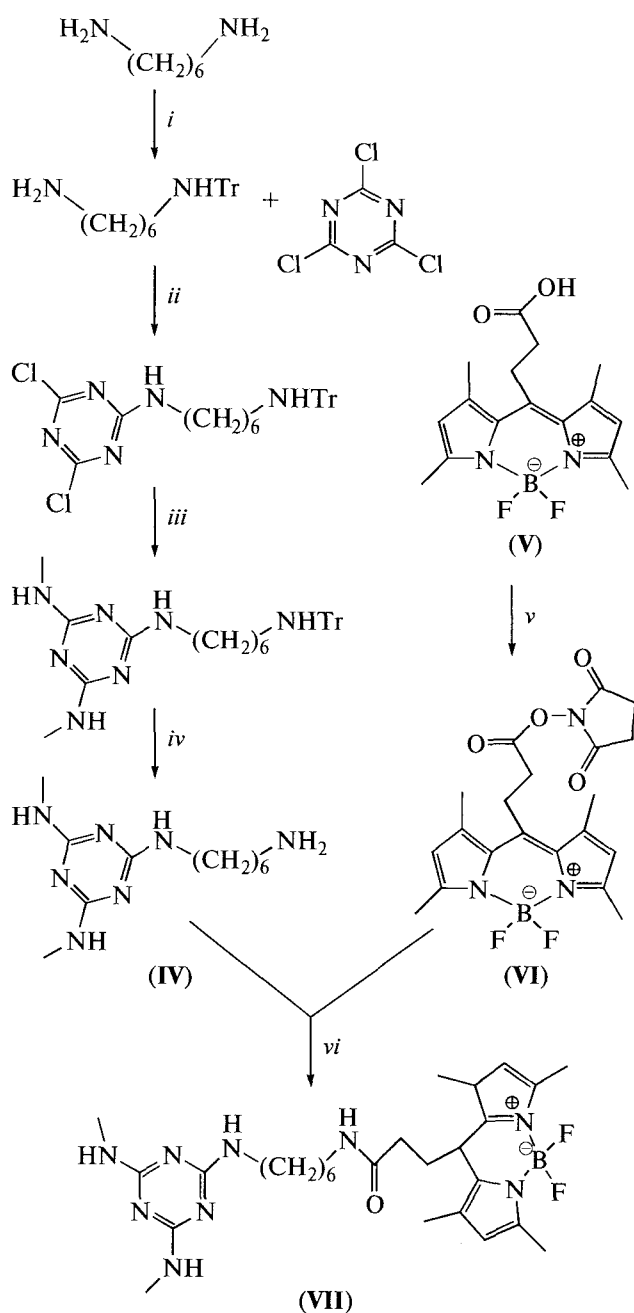


Схема 2. Синтез конъюгата 4,4-дифтор-4-бора-3а, 4а-диаза-*s*-индаценпропионовой кислоты с производным тримеламина, содержащим аминоалкильный спейсер. *i* – $\text{TrCl}/\text{DBU}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 0°C , 30 мин (выход 98%); *ii* – $\text{DIPEA}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0°C , 30 мин; *iii* – $\text{CH}_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$, 160°C , 6 ч; *iv* – 80% CH_3COOH , 100°C , 1 ч [выход соединения (IV) 98%]; *v* – $\text{DCC}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 25°C , 10 мин [выход соединения (VI) 95%]; *vi* – CH_2Cl_2 , 25°C , 20 мин [выход соединения (VII) 72%]. Для (VII): ^1H -ЯМР: δ 6.02 (2 H, с, ВODIPY, 3H, 6H), 5.90 (1 H, уш. с, C(O)-NH), 5.15 (3 H, уш. с, *s*-триазин, NH), 3.31–3.25 (4 H, м, *s*-триазин, NH-CH₂, ВODIPY, CH₂), 3.19 (2 H, к, *J* 6.5 Гц, C(O)NH-CH₂), 2.88 (6 H, уш. с, *s*-триазин, NH-CH₃), 2.48 (6 H, с, ВODIPY, 1,7-CH₃), 2.40 (8 H, м, ВODIPY, 3,5-CH₃, ВODIPY, CH₂-CH₂), 1.54–1.29 (8 H, м, *s*-триазин, NHCH₂-(CH₂)₄). Масс-спектр (ESI): 556 (M^+).

Параллельно проводили синтез *N*-оксисукцинимидного эфира ВODIPY (VI). Для этого 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-пропионовую кислоту (V), полученную как описано в работе [10], обработали *N*-гидроксисукцинимидом и DCC. В результате взаимодействия эфира (VI) и соединения (IV) было получено флуоресцентное производное ТММ, содержащее остаток ВODIPY (ТММВ, (VII)) (λ_{max} 499 нм, $\epsilon \sim 8 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, λ_{ex} 500 нм, λ_{em} 506 нм). Структура соединения (VII), а также структуры всех полученных в ходе синтеза промежуточных соединений подтверждались с помощью методов ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Соединение (VII) также было нами использовано для кросс-сшивок дуплексов ДНК, структуры которых показаны на рис. 2, в присутствии и в отсутствие формальдегида. Включение ТММВ в двухцепочечную ДНК исследовалось с помощью ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ (рис. 3). Полученные результаты однозначно показали наличие флуоресцентной метки в сшитой ДНК. Обработка ДНК только ТММВ в отсутствие формальдегида не давала ISC. В использованных нами условиях ТММВ не присоединялся к одноцепочечной ДНК. Таким образом, нами было получено дополнительное подтверждение того, что остаток триазина непосредственно вовлечен в структуру кросс-сшитой ДНК.

Ранее было высказано предположение, что ISC под действием ТМ происходят предпочтительно в местах GC-сайтов [5], что подтверждалось опытами по термической денатурации ДНК, кросс-сшитой ТМ. Было также сделано предположение, что даже распределение GC- и AT-богатых последовательностей в непосредственной близости к сайту связывания ТМ может иметь значение для осуществления сшивки [7]. Предварительные эксперименты, проведенные нами по определению в ДНК мест связывания ТМ, показали, что дуплексы (XI) и (XII), состоящие из олигонуклеотидов, последовательность которых не содержала GC-сайтов не давали кросс-сшивок при обработке ТМ (или ТММВ в присутствии формальдегида). В то время как дуплексы, состоящие из олигонуклеотидов, имеющих в своих последовательностях эти сайты, стабильно сшивались под действием этих реагентов. Эксперименты по определению предпочтительных участков образования поперечной сшивки в двухцепочечной ДНК под действием ТМ и его производных с использованием дуплексов, содержащих только GC- или CG-сайты, а также по определению структурных особенностей образующегося при этом ДНК-аддукта продолжаются.

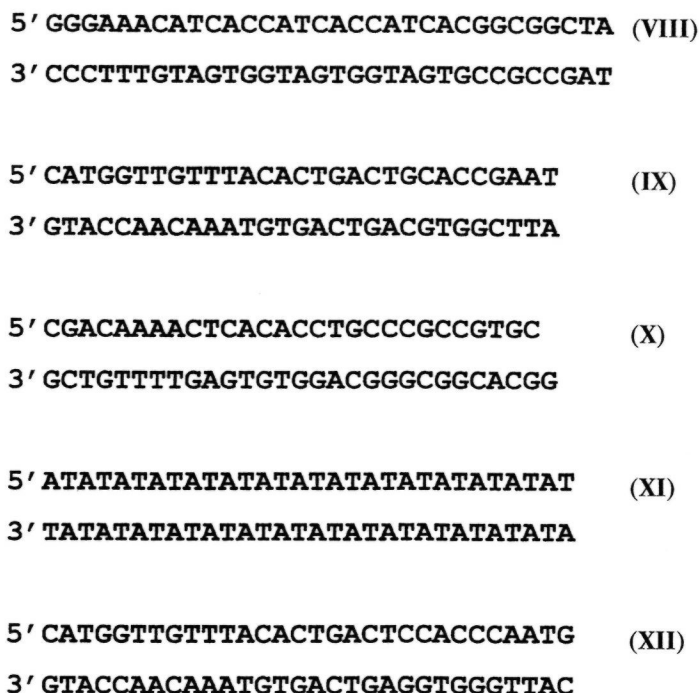


Рис. 2. Дуплексы, использованные для проведения кросс-сшивок с помощью ТМ, ТММ и ТММВ.

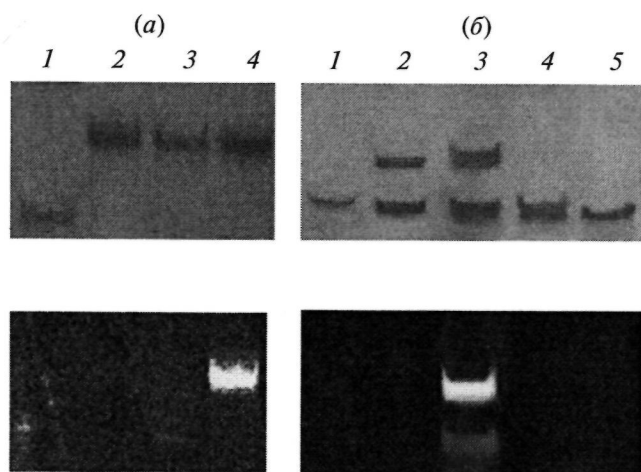


Рис. 3. Электрофорез в 10% ПААГ продуктов кросс-сшивки дуплекса (VIII) под действием ТМ и ТММВ. (а) — Электрофорез в нативных условиях: 1 — одноцепочечный олигонуклеотид, 2 — дуплекс, не подвергавшийся обработке кросс-сшивающими реагентами, 3 — дуплекс, обработанный ТМ, 4 — дуплекс, обработанный ТММВ. (б) — Электрофорез в денатурирующих условиях. 1 и 5 — одноцепочечные олигонуклеотиды, из которых составлен дуплекс; 2 — дуплекс, обработанный ТМ, 3 — дуплекс, обработанный ТММВ; 4 — денатурированный дуплекс, не подвергавшийся обработке кросс-сшивающими реагентами. Фотографии сделаны в отраженном УФ-свете при 254 нм (верх) и в УФ-свете при 365 нм (низ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анципович С.И., Орецкая Т.С. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 274–393.
2. Legha S., Slavik M., Carter S. // Cancer. 1976. V. 38. P. 1535–1541.
3. Jackson C., Crabb T., Gibson M., Godfrey R., Saunders R., Thurston D. // Pharm. Sci. 1991. V. 80. P. 245–251.
4. Coley H. // Gen. Pharmac. 1997. V. 28. P. 177–182.
5. Scott R., Robert M. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 2723–2795.
6. Coley H.M., Jarman M., Brooks N., Kubota T., Goddard P.M., Jones M., Lee N., Owens D., Halbert G.W., Judson I.R. // Int. J. Cancer. 1996. V. 68. P. 356–363.
7. Ramurthy S., Miller M.J. // J. Org. Chem. 1996. V. 61. P. 4120–4124.
8. Jackson C., Hartley J., Jenkins T., Godfrey R., Saunders R., Thurston D. // Biochem. Pharmacol. 1991. V. 42. P. 2091–2097.
9. Cumber A., Ross J. // Chem.-Biol. Interactions. 1977. V. 17. P. 349–357.
10. Wang D., Fan J., Gao X., Wang B., Sun S., Peng X. // J. Org. Chem. 2009. V. 74. P. 7675–7683.

Application of BODIPY – Trimethylmelamine Conjugate for DNA Cross-Linking *in vitro*

V. A. Efimov[†], S. V. Fedunin, and O. G. Chakhmakhcheva[#]

[#]Phone: +7(495) 336-59-11; e-mail: eva@mx.ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho–Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia

Conjugate the fluorescent dye 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indatsen-8-propionic acid (BODIPY) and N^2, N^4, N^6 -trimethylmelamine was obtained. It was shown that this compound in the presence of formaldehyde generates covalent cross-links of DNA strands *in vitro*.

Keywords: DNA, interstrand cross-linking reagents, hexamethylmelamine, trimethylmelamine, trimelamol, BODIPY.