

# DNA AMB TRAMS D'ADENINES I INTERACCIO AMB DROGUES. ESTRUCTURA DEL COMPLEXE d(CGCAAATTTGCG) AMB HOECHST 33258

M. C. VEGA, I. GARCIA, M. COLL

Dept. d'Enginyeria Química de la U.P.C. i Centre d'Investigació i Desenvolupament del

C.S.I.C. Diagonal 647, 08028 Barcelona

## RESUM

Hem cristal·litzat i resolt l'estructura del complexe Hoechst 33258-d(CGCAAATTTGCG) amb una resolució de 2.4 Å. En l'estructura final la droga s'uneix a la seqüència -ATTT- amb el grup piperazina adjacent a la regió GC. Aquesta interacció força a la formació d'un pont d'hidrogen bifurcat entre les bases T19 i A5 de la cadena veïna.

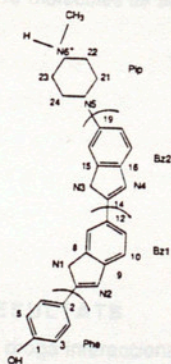
## INTRODUCCIO

Les drogues que s'uneixen al solc petit del DNA com són la netropsina, el berenil, la distamicina i la Hoechst 33258 tenen característiques estructurals comuns. Totes elles són conformacionalment planes, tenen grups aromàtics, la seva càrrega formal és positiva i la seva forma recorda a la de mitja lluna, fet que permeteix que la droga segueixi el solc petit del DNA. Aquest tipus de drogues presenten una preferència general per els trams no rics en GC degut a que la presència del grup -NH<sub>2</sub> de la guanina impideix l'interacció de la droga amb el DNA. Amés el solc petit en trams

de guaninas és més ampli que el solc petit de trams d'adenines tenen aquest últim la mida adient per que, després d'una interacció electrostàtica no específica, (ambdós tenen càrregues de diferent signe) es produeixin interaccions de van der Waals entre la cadena de fosfats-desoxirribosa i la droga. (Wang )

Hoechst 33258 és una droga sintètica amb activitat antihelmíntica que s'utilitza sovint com tenyidor fluorescent del DNA (Fig. 1)

Fig1. Estructura de la Hoechst 33258. Té tres grups estructurals: un fenol, dues benzamidines i una piperazina sobre els quals presenta els seus tres angles de torsió.



Hem fet una anàlisi estructural comparant diverses seqüències de DNA acomplexades amb la Hoechst 33258, com s'arà ón la seqüència alternant -ATAT- (Carrondo et al.1989) , la seqüència -AATT- (Pjura et al. 1987 ,Teng et al. 1988, Quintana et al.1991) i també diferents complexos amb seqüència -A3T3- amb diferents drogues (Distamicina (Coll et al.), Netropsina (Taberneró et al.), Berenil (Brown et al. 1992)).

## MATERIALS I METODES

Els cristalls van créixer en gotes assegudes de 40 µl de solucions de 10mM de dodecàmer, 10mM



Hoechst 33258, 65% MPD, 10mM cacodilat sódic i 7mM d'espermina amb depòsit de 50% de MPD. Es van obtenir dos cristalls de dimensions aproximades 0.2x0.4x0.7 mm i 0.2x0.35x0.5 mm. els cristalls van ser montats en capilars i segellats amb una gota de tampó de harvesting.

Les dades van ser recollides a 2.4 Å de resolució amb un detector bidimensional Imaging Plate instal·lat en un generador d'ànode rotatori Elliot GX21. Es van recollir 2253 reflexions a un nivell  $2\sigma(F)$  de les quals 2253 són úniques.

Els cristalls van ser similars als de DNA natiu amb un grup ortorròmbic P212121 i amb una cel·la de dimensions  $a=25.51$   $b=41.45$   $c=65.31$ .

Les dades cristal·logràfiques van ser processades amb el conjunt de programes MOSFLM i els dos espectres van ser reescal·lats amb el conjunt de programes de PROTEIN. Les coordenades del DNA es van afinar com un cos rígid utilitzant el programa XPLOR. A 2.5 Å de resolució es va poder observar, en un map de diferències de Fourier, la densitat corresponent a la droga al solc petit, on es van inserar els àtoms de la droga utilitzant el programa TOM.

Degut a que la molècula de la droga no és simètrica pot presentar dues conformacions diferents en el cristall. Van ser estudiades les dues possibilitats i només presentava interaccions estabilitzants l'orientació amb el grup de la piperazina a prop de la regió GC.

Per veure la posició de la droga en el solc petit del DNA es va fer un *omit map* (sense els àtoms de la droga) tal com es mostra a la Fig 2. No es va observar cap mena de desordre en la densitat electrònica de la droga. No van ser localitzats cap ió ni cap molècula d'espermina. A l'estructura final hi ha 19 molècules de solvent i presenta un Rf del 21%.

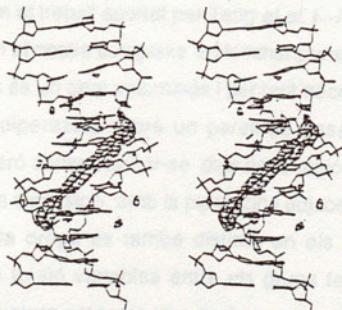


Fig 2. Representació estereoscòpica de l'*omit map* de l'estructura final en el que es veu la perfecta inserció de la droga en la densitat electrònica sense cap desordre.

## RESULTATS

La droga interacciona amb una seqüència -ATTT- (Fig.3) i presenta dos punts bifurcats a nivell del N1 i N3 amb els àtoms O2 de les timines i N3 de les adenines. L'oxigen del grup fenol interacciona amb un sucre i el N6 interacciona amb el sucre d'una citosina d'una molècula simètrica de DNA (Taula 1).

El DNA presenta un molt alt propeller twist en la T19. Aquesta base es prou forçada i interacciona feblement amb l'adenina 5 del parell de bases anterior (la distància entre l'àtom N4(A5) i O2(T19) és de 3.28Å).



Hoechst 33258 atom	DNA atom	Distance Å
O1	O4' (T21)	3.58
N1	O2 (T19)	2.61
	O2 (T7)	2.99
N3	O2 (T8)	2.96
	N3 (A18)	3.27
N5	O2 (T9)	3.51
N6	O3' (#C 24)	3.20

Taula 1. Ponts d'hidrògen entre la droga i el DNA.

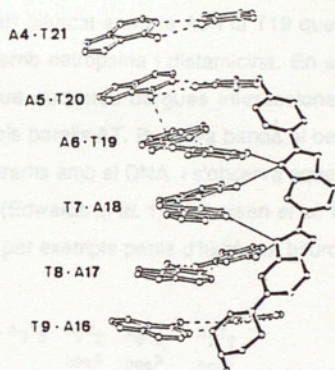


Fig. 3. Representació dels ponts d'hidrògen entre la droga i el dodecàmer.

## DISCUSSIO

La Hoechst presenta només dos atòms de N dels grups benzamidínics susceptibles de formar pont d'hidrògen. Així fa que no sigui tan exigent en la seqüència d'unió com la netropsina i la distamicina amb 4-6 llocs susceptibles de formar pont d'hidrògen. Així doncs, la seqüència d'unió de la Hoechst varia segons el complex: amb la seqüència alternant Hoechst-d(CGCGATATCGCG) la seqüència d'unió és -TATC-; en els complexos amb el tram -AATT- la seqüència d'unió varia segons l'autor: -AATT- en el treball aportat per Teng *et al.* i -ATTC- en els treballs aportats per Pjura *et al.* i Quintana *et al.*. En el nostre complex la Hoechst s'uneix a la seqüència -ATTT-.

En tots la piperazina és un grup voluminós i per tant necessita més lloc per acomodar-se. Pjura i Quintana presenten la piperazina sobre un parell de bases GC i Teng presenta la piperazina adjacent a la regió GC però sense col·locar-se dins de la regió GC. En el nostre complex la Hoechst presenta aquesta mateixa disposició, amb la piperazina adjacent al parell de bases GC.

La conformació de la droga es també distinta en els diferents treballs aportats. La droga presenta tres angles de torsió variables entre els grups fenol, benzamidina 1 i 2, i piperazina. (Taula 2). La nostra estructura presenta uns avaluors en aquests angles que indiquen que la droga no es troba gaire tensionada. L'angle més accentuat és de 60° entre la benzamidina 2 i la piperazina presentat per Pjura, que indica una gran tensió. Aquest complex va ser estudiat més tard per Quintana i els resultats van ser més semblants als obtinguts per Teng (Taula 2).

	HT-A3T3	HT-ATAT	HT-A2T2 (Teng et al.)	HT-A2T2 (Pjura et al.)	HT-A2T2 (Quintana et al.)
Phe-Bz1	12	18	8	0	5
Bz1-Bz2	19	13	32	36	12
Bz2-Pip	8	21	14	60	34

Taula 2. Angles de torsió entre els tres grups estructurals de la Hoechst-33258.



La conformació del DNA presenta el pont d'hidrògen bifurcat entre la A5 i la T19 que també s'observa en els complexos de la mateixa seqüència amb netropsina i distamicina. En aquests últims aquest pont d'hidrògen és més fort degut a que aquestes drogues interaccionen més fortament amb el DNA accentuant el "propeller twist" d'els parells AT. Per altra banda el berenil té una interacció molt més feble, només interactua pels extrems amb el DNA i s'observa aquest pont d'hidrògen entre A5 i T19. Els canvis entre el DNA natiu (Edwards *et al.* 1982; Larsen *et al.* 1991) i el DNA acomplexat són de caràcter local i poden forçar, per exemple ponts d'hidrògen bifurcats en el solc gran del DNA (Taula 3).

Base pair	A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> <sup>a</sup>	A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> <sup>b</sup>	A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> <sup>c</sup>	A <sub>3</sub> T <sub>3</sub> <sup>d</sup>	A <sub>3</sub> T <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> <sup>a</sup>	A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> <sup>b</sup>	A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> <sup>c</sup>
1-24	-9	-8	-7	-12	-2	-3	-19	-17
2-23	-16	-22	-13	-13	-13	-10	-20	-16
3-23	-6	-5	-18	-7	-9	-8	-20	-8
4-21	-13	-2	-14	-13	-6	-9	-9	-6
5-20	-17	-13	-17	-22	-8	-10	-19	-23
6-19	-22	-26	-20	-18	-18	-28	-22	-20
7-18	-20	-11	-19	-18	-17	-17	-21	-27
8-17	-19	-13	-17	-18	-14	-7	-21	-16
9-16	-16	-16	-24	-12	-16	-9	-15	-10
10-15	-6	-15	-4	-5	-9	-8	-9	5
11-14	-23	-21	-10	-21	-12	-20	-26	-26
12-13	-7	-0.1	-14	11	-3	-7	3	10
Average of b.p. A <sub>3</sub> T <sub>3</sub>	-16	-13	-18	-17	-11	-13	-18	-17

**Taula 3.** Propeller twist de diferents complexos de droga-DNA. Apart de l'alt propeller twist associat a les zones riques en AT, cal destacar l'alt propeller twist associat a la T19 que provoca la interacció amb la A5. L'alt propeller twist associat a les GC 11-14 i G2-C23 es degut al empaquetament del DNA en el cristall.

## BIBLIOGRAFIA

- Brown, D.G.; Sanderson, M.S.; Garman, E. and Neidle S. *J. Mol. Biol.* **226**, 481-490 (1992).
- Carrondo, M.A.A.F. de C.T.; Coll, M.; Aymami, J.; Wang, H.-J.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Rich, A. *Biochemistry* **28**, 7849-7859 (1989).
- Coll, M.; Frederick, C.A.; Wang, H.-J.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8385-8389 (1987).
- Edwards, K.J.; Brown, D.G.; Spink, N.; Skelly, J.V.; Neidle, S. *J. M. B.* **226**, 1161-1173 (1992).
- Pjura, P.E.; Grzeskowiak, K. and Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **197**, 257-271 (1987).
- Quintana, J.R. Lipanov, A.A. and Dickerson, R.E. *Biochemistry* **30**, N°42, 10294-10306
- Larsen, T.A.; Kpoka, M.L.; Dickerson, R.E. *Biochemistry* **30**, 4442-4449 (1991).
- Taberner, L.; verdaguer, N.; Coll, M.; Fita, I.; van der Marel, G.A.; van Bom, J.H.; Rich, A. and Aymami, J. *Biochemistry* (en premsa).
- Teng, M.; Usman, N.; Frederick, C.A.; Wang, H.-J. *Nucleic Acids Research*, **16**, N°6, 2671-2690 (1988.)