



УДК 547.785.5'55.1'963.32 : 535.33/34

© 1991 г.

С. Д. Иванов, А. В. Гарабаджия*, Н. Н. Ртищев*,
Е. И. Фомина, О. Ю. Колосова*

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

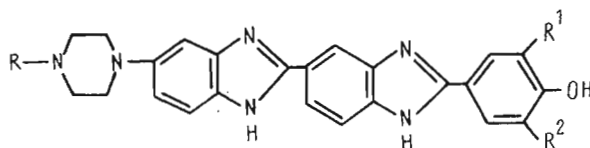
Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт
Минздрава СССР, Ленинград;

*Ленинградский технологический институт им. Ленсовета, Ленинград

Исследованы спектры поглощения и флуоресценции ряда производных бисбензимидазола для оценки эффективности их связывания с молекулами ДНК. Определена значимость радикалов у фенильного и пиперазинового циклов люминофоров при взаимодействии с полинуклеотидом. Показано, что повышение флуоресценции красителя Хехст 33258 в смеси с рРНК обусловлено наличием в полинуклеотиде двухцепочечных шпильчатых структур.

Изучению люминесцентных свойств бисбензимидазольных соединений посвящено значительное число работ ([1—7] и др.). Однако влияние радикалов у терминальных циклов (фенильного и пиперазинового) этого класса флуоресцирующих ДНК-лигандов на спектральные свойства их в комплексе с субстратом не исследовано. Кроме того, недавно было показано, что возрастанию свечения потенциально активных люминесцентных меток способствует неполярная природа их микроокружения [8—10]. Поэтому значение структурного фактора терминальной группировки для образования флуоресцирующего комплекса краситель — субстрат представлялось целесообразным оценить при сопоставлении результатов изменения люминесцентных свойств бисбензимидазолов в присутствии ДНК и этих же соединений в спирте. Вместе с тем в связи с известными данными об изменении флуоресценции красителя Хехст 33258 в комплексах с искусственными полирибонуклеотидами [11] в настоящей работе были изучены спектральные свойства бисбензимидазольных соединений в присутствии не только ДНК, но и РНК.

Исследовались спектры поглощения и флуоресценции следующих соединений: 2-[2'-(4-гидроксифенил)бензимидазол-5'(6')-ил]-5(6)-(1-пиперазинил)бензимидазол (I); 2-[2'-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)бензимидазол-5'(6')-ил]-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол (II); 2-[2'-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)бензимидазол-5'(6')-ил]-5(6)-(4-ацетилпиперазин-1-ил)бензимидазол (III). Для сравнения использовали коммерческий флуорофор Хехст 33258 — 2-[2'-(4-гидроксифенил)бензимидазол-5'(6')-ил]-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол (IV).



	R	R ¹	R ²
(I)	H	H	H
(II)	Me	Bu ^t	Bu ^t
(III)	Ac	Bu ^t	Bu ^t
(IV)	Me	H	H

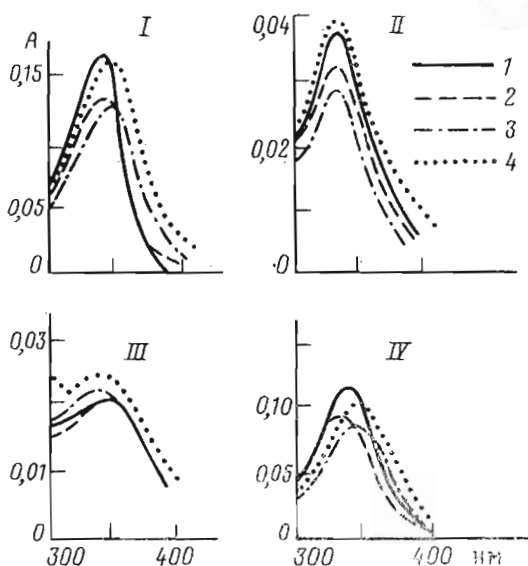


Рис. 1. Спектры поглощения бисбензимидазолов (I)–(IV). Концентрации флуорофоров 2 мкг/мл при соотношении концентраций ДНК – флуорофор 0 (1), 0,5 (2), 10 (3) и 50 (4)

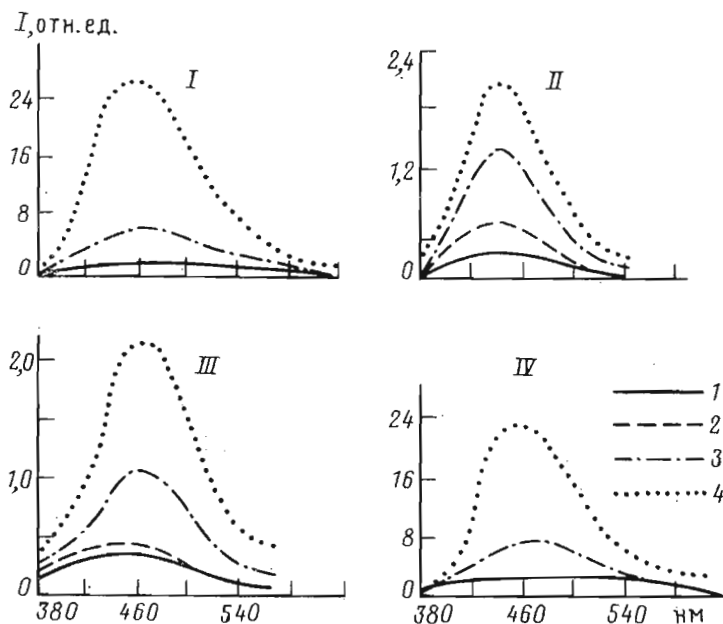


Рис. 2. Спектры флуоресценции бисбензимидазолов (I)–(IV). Концентрации флуорофоров 0,5 мкг/мл. Условные обозначения на графиках те же, что и на рис. 1. Условия измерения: спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии 3 нм, $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм. Для соединений (I) и (IV) спектральные кривые 1 и 2 совпадают

Соединения (I)–(IV) имели полосы поглощения в ближней ультрафиолетовой области спектра (рис. 1, таблица). Введение метильной группы в пиперазиновый цикл (ср. соединения (I) и (IV)) вызывало небольшой батохромный сдвиг (с 345 до 350 нм); в противоположность этому у соединения (II) с *трет*-бутилзамещенным фенильным циклом максимум поглощения смещался гипсохромно. Напротив, ацилирование атома азота пиперазинового фрагмента (соединение (III)) вызывало батохромное смещение максимума спектра по сравнению со спектром N-метилзамещенного аналога (II). Однако в целом изменения в спектрах поглощения модифицированных бензимидазолов (II) – (IV) без ДНК были незначительными.

Несколько большее влияние оказывали вышеназванные модификации соединений на показатели люминесценции изучавшихся бисбензимидазо-

**Изменения спектральных свойств бисбензимидазольных производных
в присутствии ДНК ***

Флуорохром		(I)	(II)	(III)	(IV)
Спектры поглощения	$\lambda_{\text{полг. макс.}} \text{ нм}$	345	340	345	350
	$(A_0 - A_{0,5})/A_0$	0,195	0,134	0,000	0,150
	$(A_0 - A_{10})/A_0$	0,218	0,206	-0,073	0,233
	$(A_0 - A_{50})/A_0$	0,034	-0,031	-0,164	0,117
Спектры флуоресценции	$\lambda_{\text{возб. макс.}} \text{ нм}$	350	340	357	350
	$\lambda_{\text{эм. макс.}} \text{ нм}$	520	500	530	520
	Квантовый выход в буфере	14,0	8,5	8,7	7,5
	$\Phi_0 \cdot 10^3$				
	$\Phi_{0,5}/\Phi_0$	2,00	2,08	2,56	1,95
	Φ_{10}/Φ_0	14,54	5,80	4,05	20,14
	Φ_{50}/Φ_0	44,70	7,63	3,11	57,10

* A_0 , $A_{0,5}$, A_{10} и A_{50} — оптическое поглощение смеси при соотношениях концентраций ДНК — лиганд 0, 0,5, 10 и 50; $\Phi_{0,5}$, Φ_{10} и Φ_{50} — квантовые выходы флуоресценции красителей при отношениях концентраций ДНК — лиганд 0,5, 10, 50; величины $\lambda_{\text{макс}}$ (нм) указаны для скорректированных спектров возбуждения и эмиссии названных красителей.

лов (рис. 2, таблица). Об этом свидетельствовали различия между величинами квантовых выходов красителей в буфере (примерно в 2 раза), а также между значениями максимумов эмиссионных полос (500—530 нм).

В присутствии ДНК величины интенсивности поглощения менялись неоднозначно (рис. 1, таблица): по мере увеличения концентрации ДНК в кювете сначала происходило снижение абсорбции, а затем (при 50-кратном избытке полинуклеотида) значение A возрастало. Изменения спектров поглощения бисбензимидазолов (I)—(IV) при добавлении ДНК свидетельствовали об их взаимодействии с полинуклеотидом. При этом связывание соединения (I) с мишенью оказалось подобным наблюдаемому для Хехста (IV) (который, как известно, специфически реагирует с А·Т-фрагментами ДНК [3]), причем при низких концентрациях полинуклеотида в более выраженной степени (см. таблицу). Изменения взаимодействия соединения (II) с субстратом также были сходны с таковыми для Хехста 33258 при отношениях концентраций ДНК — лиганд 0,5 и 10. Однако при повышении этого соотношения до 50 связывание красителя (II) в комплексе с ДНК нарушалось по сравнению с аналогичным показателем для Хехста (IV). Наиболее отличающимся от коммерческого красителя по связыванию с ДНК был бисбензимидазол (III).

Согласно известным данным [3, 12], наиболее вероятно, что основной вклад в образование комплекса лиганда с ДНК вносят взаимодействия типа межмолекулярных водородных связей. Они могут возникать с участием атомов азота гетероциклов лиганда, с одной стороны, и с вовлечением атомов N3 аденина или O2 тимина ДНК — с другой. Кроме того, в комплексообразовании могут участвовать терминальные фенильный и пиперазиновый циклы. Исходя из полученных нами спектров поглощения смесей ряда бисбензимидазольных производных с ДНК, можно полагать, что удаление метильной группы у N4-атома пиперазина может в некоторой степени даже усилить взаимодействие лиганда с субстратом при низких соотношениях концентраций ДНК — лиганд. В противоположность этому ацетилирование N4-атома пиперазина ослабляет его взаимосвязь с ДНК. С другой стороны, *трет*-бутилирование фенильного цикла однозначно ухудшает взаимодействие ДНК с лигандом. Это скорее всего следствие стерического препятствия, создаваемого объемистыми радикалами для проникновения в малый желоб двойной спирали ДНК.

Результаты изучения люминесцентных свойств красителей в присутствии субстрата (рис. 2, таблица) свидетельствовали о том, что если положение полосы флуоресценции и ее контур при повышении концентрации ДНК для всех изученных бисбензимидазолов в общем не претерпевали радикаль-

ных изменений, то рост интенсивности свечения для всех представленных соединений происходил весьма неодинаково. Для соединения (I) в сравнении с Хехстом (IV) наблюдалось несколько большее возрастание интенсивности флуоресценции комплекса в случае относительно низких концентраций ДНК в пробе ($C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 0,5$). При более высоких соотношениях концентраций ДНК — краситель (10 и 50) этот эффект нивелировался. Модификация бисбензимидазолов путем *трет*-бутилирования фенильного цикла (II), а также последующее ацетилирование атома N4 пиперазина (III) подавляли возрастание квантовых выходов флуоресцирующих лигандов при взаимодействии их с ДНК при ее 10- и 50-кратных избытках. Таким образом, соединения (II) и (III) — менее эффективные флуорохромы для определения полинуклеотида, чем Хехст 33258, тогда как соединение (I) в некоторой степени даже превосходит коммерческий краситель при измерениях концентраций ДНК. Специфическое повышение флуоресцентных свойств бисбензимидазола (I) определяется скорее всего достаточно прочным связыванием лиганда субстратом, превосходящим таковое для Хехста при низких концентрациях красителя.

Вместе с тем для люминесцирующих бисбензимидазолов подобно молекулам фенилбензазолов [8, 9] важной представляется их способность специфически реагировать на окружение [10]. Так же, как ранее наблюдалось для фенилбензазолов [9], моделью комплекса флуорофор — ДНК может стать ассоциат люминесцирующего бисбензимидазола с молекулой спирта. При замене водной среды этанолом для соединения (II) наблюдалось смещение $\lambda_{\text{эм. макс}}$ с 500 до 480 нм и происходило возрастание квантового выхода флуоресценции в 59 раз, а для соединения (III) $\lambda_{\text{эм. макс}}$ смещалась с 530 до 475 нм, тогда как ϕ возрастал в 53 раза, что близко к предельным значениям $\phi_{\text{ДНК}}/\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ для красителя Хехст 33258 [5]. Для соединения (I) гипсохромный сдвиг в спирте достигал максимального значения (100 нм), при этом отмечался рост величины ϕ в 21 раз. Другие авторы, наблюдавшие подобный эффект при использовании спиртов и диоксана в модельных экспериментах для Хехста 33258, высказали предположение, что условия, создающиеся в малом желобе двойной спирали для комплекса бисбензимидазол — ДНК, аналогичны неполярному микроокружению лиганда [10]. Сопоставление результатов изменения флуоресцентных свойств бисбензимидазолов при смене водной среды на спиртовую с данными таблицы позволяет заключить, что соединения (II) и (III), имеющие *трет*-бутильные радикалы, которые препятствуют проникновению лигандов в малый желоб дуплекса, не могут быть использованы в качестве высокоэффективной, чувствительной флуоресцентной метки на ДНК в отличие от бисбензимидазолов (I) и (IV).

Ранее нами было показано, что монобензимидазольное соединение — 2-(4-гидроксифенил)-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол имеет достаточно высокую величину собственной люминесценции, но при взаимодействии с ДНК отмечалось лишь небольшое возрастание (+15%) его флуоресцентного свечения [13]. Краситель Хехст 33258 (IV) отличается от вышеназванного только наличием второго бензимидазольного гетероцикла и низкой величиной собственной флуоресценции. Очевидно, введение в структуру Хехста 33258 именно этого компонента вызывает подавление свечения монобензимидазольного соединения. Следовательно, у не связанного с субстратом бисбензимидазола, по-видимому, происходит взаимное влияние бензимидазольных гетероциклов друг на друга и при этом подавление флуоресцентных свойств составляющих его компонентов. При образовании комплекса Хехст — ДНК это взаимное ингибирующее влияние ослабляется, можно полагать, вследствие более активного взаимодействия гетероциклов с А·Т-сегментами в малом желобе двойной спирали ДНК [3, 12], чем друг с другом, что приводит к восстановлению флуоресценции бензимидазольных гетероциклов. Повышение же свечения бисбензимидазолов в спиртах, вероятно, происходит также вследствие ослабления взаимного подавляющего влияния гетероциклов, но в данном случае снятие этого ингибирования обуславливается путем их изоляции друг от друга, что обеспечивает неполярная природа их микроокружения.

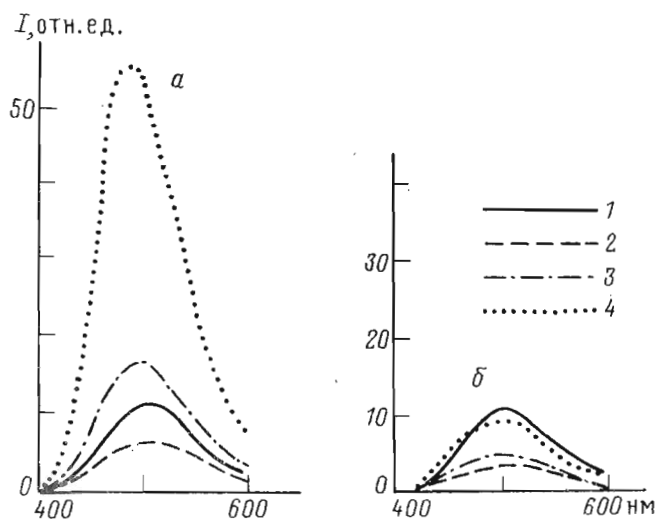


Рис. 3. Спектры флуоресценции Хеста 33258 (IV) в смеси с рРНК, содержащей двухцепочечные шпильчатые структуры (а) или после удаления шпилек (б). Условные обозначения на графиках и по осям координат те же, что и на рис. 2. Условия измерения: спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии 3 нм, $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм

Кроме того, мы определили изменения интенсивности флуоресценции Хеста 33258 (IV) при его взаимодействии с РНК. В качестве субстрата были использованы рибосомная РНК тимуса крысы, содержащая 50% двухцепочечных шпильчатых структур, и этот же препарат после удаления шпилек глиоксилированием. Оказалось, что при наличии в препарате полирибонуклеотида двухцепочечных фрагментов интенсивность флуоресценции возрастает в зависимости от повышения концентрации РНК (рис. 3а). Однако после разрушения шпилек в биополимере с помощью глиоксаля максимальная люминесценция красителя (IV) в смеси с РНК не достигала таковой даже для свободного красителя в буфере (рис. 3б). Эти данные свидетельствуют о способности красителя Хест 33258 образовывать специфический люминесцентный комплекс с двухцепочечными природными полинуклеотидами, находящимися не только в В-, но и в А-конформации [14, 15]. Вместе с тем разрушение двуспиральных структур в рибонуклеотиде исключает вообще какую-либо возможность специфического повышения флуоресценции люминофора даже при значительных увеличениях соотношения концентраций РНК—лиганд. Это может указывать на то, что двуспиральность полинуклеотида — обязательная черта субстрата, обуславливающего возрастание флуоресценции бензимидазола путем формирования в последнем копланарной структуры, вызванной взаимодействием красителя с обогащенными аденином сегментами дуплекса и/или путем создания условий, подобных его неполярному микроокружению.

Возрастание интенсивности флуоресценции Хеста 33258 в присутствии искусственных полирибонуклеотидов наблюдалось и другими исследователями [11]. Вместе с тем, по мнению этих авторов, комплекс, образуемый лигандом с полирибонуклеотидами, существенно отличается от комплекса краситель (IV)—ДНК. В частности, Стейнер и Стернберг предположили, что молекула красителя связывается с субстратом в значительной степени силами электростатического взаимодействия и лишь частично лежит в спиральном желобе рибонуклеотидного полимера. Учитывая влияние рН среды на люминесценцию красителя [16] и наличие лишь 50% двухцепочечных структур в использованной нами рибонуклеиновой кислоте, рассчитанное нами возрастание интенсивности флуоресценции комплекса соединения (IV)—рРНК в области шпилек было примерно в 2 раза ниже, чем для аналогичного комплекса с ДНК при максимальном соотно-

шении концентраций субстрат — краситель. Следовательно, полученные в настоящей работе данные согласуются с высказанным выше предположением.

Таким образом, спектральные характеристики свидетельствуют о взаимодействии всех изученных бисбензимидазолов с полинуклеотидами. Основное требование к бисбензимидазольным соединениям, предлагаемым к использованию в качестве флуоресцентных меток для ДНК, — это низкая величина квантового выхода флуоресценции в воде ($\sim 0,01$) при максимальном отношении квантовых выходов люминесценции в средах спирт/вода. Вместе с тем у лиганда, очевидно, должны отсутствовать группировки, препятствующие его стерическому проникновению в малый желоб дуплекса. Повышение флуоресценции красителя Хехст 33258 в смеси с рРНК обусловлено наличием в последней двухцепочечных шпильчатых структур.

Экспериментальная часть

Соединения (I) и (III) были синтезированы И. В. Складовой и соавт. [17], а соединение (II) — Н. Ю. Соколовой и др. [18]. Коммерческий флуорофор Хехст 33258 был получен от фирмы Serva (ФРГ). При изучении взаимодействия красителей с ДНК анализ производили в трис-версеновом буфере при pH 7,2, как описано ранее [9]. В случае исследования комплексов Хехста 33258 с РНК применяли 0,1 М ацетатный буфер (pH 5,5) [19]. В качестве субстрата использовали ДНК тимуса теленка (Sigma, США) и рРНК тимуса крыс, содержащую или 50% шпильчатых структур, или одноцепочечный полимер, полученный путем обработки вышеуказанного субстрата глиоксалем [20]. Препараты РНК были любезно предоставлены Е. И. Евтушенко (лаборатория генной инженерии Центрального научно-исследовательского рентгено-радиологического института Минздрава СССР). Все измерения были выполнены при $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре фирмы Beckman (Австрия), модель 35; флуоресценцию проб анализировали на спектрофлуориметре фирмы Hitachi (Япония), модель 850. Квантовые выходы флуоресценции определяли относительным методом с использованием в качестве стандарта раствора сульфата хинина в 1 М серной кислоте ($\phi = 0,55$) [21]. В связи с тем что расстояние между максимумами полос поглощения и флуоресценции было достаточно большим ($\sim 100 \text{ нм}$) и перекрывание спектров практически отсутствовало, расчет соотношения квантовых выходов $\phi_{\text{ДНК}}/\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ осуществляли не по отношению площадей под спектральными кривыми, а исходя из максимумов величин поглощения и флуоресценции соединений при соответствующих длинах волн.

Авторы выражают благодарность проф. О. Ф. Гинзбургу (Ленинградский технологический институт им. Ленсовета) за полезные советы при проведении работы и обсуждении результатов при подготовке рукописи к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller W., Gautier F. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 54. № 2. P. 385—394.
2. Weisblum B., Haenssler E. // Chromosoma. 1974. V. 46. № 3. P. 255—260.
3. Михайлов М. В., Заседателев А. С., Крылов А. С., Гурский Г. В. // Молекулярная биология. 1981. Т. 15. № 3. С. 690—705.
4. Умцакая В. Н., Рослов А. А., Розанов Ю. М., Гарабаджу А. В. // Молекулярная биология. 1989. Т. 23. № 2. С. 690—705.
5. Bontemps J., Houssier C., Fredericq E. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. № 6. P. 971—984.
6. Latt S. A., Wohleb J. C. // Chromosoma. 1975. V. 52. № 4. P. 297—316.
7. Zimmer Ch., Wahnert U. // Progr. Biophys. Molec. Biol. 1986. V. 47. № 1. P. 31—112.
8. Ртищев Н. И., Лебедева Г. К., Каитко И. Я., Ельцов А. В. // Журн. общ. химии. 1988. Т. 58. Вып. 9. С. 2148—2163.
9. Иванов С. Д., Каитко И. Я., Ртищев Н. И., Фомина Е. И., Нагорская Л. П. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 5. С. 648—655.
10. Jin R., Breslauer K. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 23. P. 8939—8942.
11. Steiner R. F., Sternberg H. // Arch. Biochem. and Biophys. 1979. V. 197. № 2. P. 580—588.
12. Kopka M. L., Pjura P. E., Goodsell D. S., Diskerson R. E. // Nucl. Acids and Molec. Biol. 1987. V. 1. P. 1—24.

13. Иванов С. Д., Гарабаджиу А. В., Фомина Е. И., Колосова О. Ю. // Тез. докл. VI конф. по спектроскопии биополимеров. Харьков, 1988. С. 142—144.
14. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 584.
15. Noller H. F., Woese C. R. // Science. 1981. V. 212. № 4493. P. 403—411.
16. Labarca C., Paigen L. // Anal. Biochem. 1980. V. 102. № 2. P. 344—352.
17. Склярова И. В., Кузнецов В. А., Соколова Н. Ю., Гарабаджиу А. В., Гинзбург О. Ф., Добрынин Я. В., Николаева Т. Г., Финько В. Е. // Хим.-фарм. журн. 1988. Т. 22. № 6. С. 697—699.
18. Соколова Н. Ю., Кузнецов В. А., Гарабаджиу А. В., Гинзбург О. Ф., Добрынин Я. В., Николаева Т. Г., Финько В. Е., Иванова Т. П. // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. № 1. С. 31—33.
19. Scoczylas B. // Acta biochim. pol. 1988. V. 35. № 1. P. 7—17.
20. Thomas P. S. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 255—266.
21. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972. С. 510.

Поступила в редакцию
11.VI.1990

После доработки
22.II.1991

S. D. IVANOV, A. V. GARABADJIU*, N. I. RTISHCHEV*, E. I. FOMINA,
O. Ju. KOLOSOVA*

SPECTRAL PROPERTIES OF BISBENZIMIDASOLES INTERACTING WITH NUCLEIC ACIDS

*Central Research Institute of Roentgenology and Radiology, Ministry of Health of the USSR,
Leningrad;
Leningrad Technological Institute, Leningrad

Absorbtion and fluorecence spectra of various bisbenzimidazole derivatives were studied to estimate the efficiency of their binding to DNA frow salmon testes. The effect of some radicals formed by the phenyl and piperazine rings of the fluorochromes on their interaction with a polynucleotide was determined. It was demonstrated that the Hoechst 33258 fluorecence's increase in presence of rRNA is due to the double-stranded hairpin structures in this polymer.