



УДК 547.785.5'55.1'963.32:535.33/34

© 1994 В. С. Сибирцев, А. В. Гарабаджиу\*, С. Д. Иванов

## МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КРАСИТЕЛЕЙ ФЕНИЛБЕНЗИМИДАЗОЛЬНОГО И ФЕНИЛИНДОЛЬНОГО РЯДА С ДНК

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт РАМН, Санкт-Петербург;

\* Санкт-Петербургский технологический институт

Ключевые слова: ДНК; красители; бензимидазолы; фенилиндолы.

Исследовано взаимодействие с ДНК некоторых красителей фенилбензимидазольного и фенилиндольного ряда путем изучения спектров поглощения, люминесцентного возбуждения и эмиссии в водных средах различного состава. Определен относительный вклад электростатических сил и водородных связей в это взаимодействие. Для оценки влияния характера микроокружения на свечение потенциально активных люминофоров были изучены спектральные свойства чистых красителей в изопропанол. На основании спектральных данных проведен компьютерный расчет параметров комплексообразования исследованных соединений. Представлены зависимости между различными их комплексообразующими и спектральными параметрами. Предложены ряды терминальных электронодонорных и электроноакцепторных группировок для целенаправленного синтеза новых флуорофоров на ДНК и сформулированы требования по их применению для различных классов соединений.

В последние десятилетия в биохимии и молекулярной биологии сформировалось и сейчас активно развивается научное направление, заключающееся в исследовании и поиске путей создания соединений, специфически связывающихся с определенными последовательностями нуклеотидов, с которыми также взаимодействуют ДНК- и РНК-полимеразы, репрессоры и т. д. Такие соединения могут быть использованы как непосредственно в качестве лекарственных препаратов, так и в качестве ДНК-тропных зондов, которые позволяют следить за состоянием объекта без его разрушения, в динамике, в обычных для него условиях. Вместе с тем они могут быть необходимы для разработки простых и экспрессных методов диагностики различных заболеваний, изучения последствий радиационных воздействий, которые основаны на анализе патологии с точки зрения изменений содержания и структуры нуклеиновых кислот в организме. При достаточно высокой специфичности такие соединения должны обладать и удобными для регистрации свойствами, в частности способностью флуоресцировать и резко изменять интенсивность люминесценции при взаимодействии с определенными субстратами.

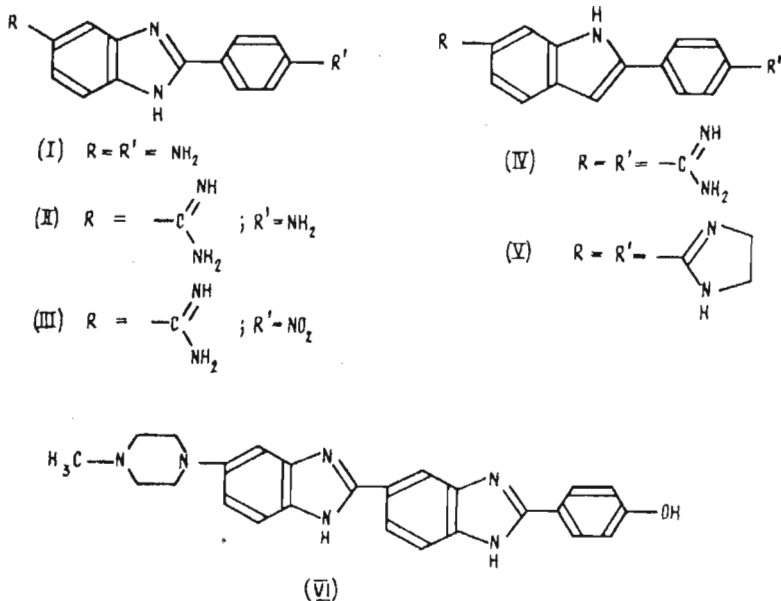
Многие из таких соединений имеют в своем составе бензимидазольные либо близкие к ним по структуре фенилиндольные фрагменты. Изучению их люминесцентных свойств посвящено значительное число работ ([1—7] и др.). В частности, было показано [8, 9], что эти два типа бензазолов предпочтительны в качестве «ядра» потенциально активного по отношению к ДНК флуорохрома. При этом для направленного синтеза новых люминесцентных меток важное значение имеет изучение не только чисто спектральных характеристик этих соединений, но и механизмов их взаимодействия с полинуклеотидами. Так, известно, что среди препаратов, непосредственно связывающихся с ДНК, некоторые образуют ковалентные связи [10]. Однако подавляющее большинство веществ этого класса образует с ДНК прочные, но обратимые нековалентные комплексы двух типов [11]. Комплексы одного типа обусловлены способностью молекул лиганда прослаиваться между парами оснований ДНК. При этом происходит локальное раскручивание двойной спирали ДНК и ее удлинение. Этот тип взаимодействия был назван Лерманом интеркаляцией и исследован для комплекса ДНК—профлавин [12, 13]. Комплексы другого типа образуют соединения (такие, например, как рассматриваемые здесь красители), относящиеся к так называемым внешнесвязывающимся лигандам. Они имеют определенные преимущества перед интеркалирующими соединениями, прежде всего в том, что обладают гораздо большей избирательностью при связывании с ДНК и при взаимодействии не нарушают целостность структуры биополимера, вследствие чего их можно использовать для изучения строения полинуклеотидов. Однако природа сил связывания с ДНК, влияние на свойства этого класса соединений различных параметров среды, микроокружения, структурных факторов, в частности характера радикалов у терминальных циклов молекулы красителя (их важная роль в изменении флуоресцентных свойств подобных соединений уже была показана ранее в работах [6, 8, 9, 14]), изучены еще недостаточно.

В связи с этим представлялось целесообразным исследовать ряд фенилбензимидазольных и фенилиндольных производных с различными терминальными заместителями для того, чтобы, во-первых, на основании спектральных характеристик определить параметры комплексообразования при их взаимодействии с ДНК, во-вторых, оценить вклад электростатических сил и водородных связей в это взаимодействие и в конечном счете построить ряд активности для возможных терминальных заместителей, а также сформулировать требования по их применению в плане создания наиболее эффективных флуорофоров для ДНК на основе различных классов соединений.

С этой целью были изучены три новых соединения, относящихся к ряду 2-фенилбензимидазолов, различающихся терминальными группировками, — 5(6)-амино-2-(4-аминофенил)бензимидазол (I), 5(6)-амидино-2-(4-аминофенил)бензимидазол (II) и 5(6)-амидино-2-(4-нитрофенил)бензимидазол (III), — а также три коммерческих флуорофора: 4',6-диамидино-2-фенилиндол ((IV), DAPI), 6-(2-имидазолин-2-ил)-2-[4-(2-имидазолин-2-ил)фенил]индол ((V), DAPI) и 2-[2-(4-гидроксифенил)бензимидазол-5(6)-ил]-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазол ((VI), Hoechst-33258).

Исследовались спектры поглощения, люминесцентного возбуждения и эмиссии при взаимодействии этих соединений с ДНК в водных средах различного состава. Поскольку известно, что в растворах с высокой ионной силой подавляются электростатические взаимодействия в системе ДНК—лиганд [7], а в растворах в 4 М мочеvine при низкой ионной силе — водородные связи [15], для оценки вклада электростатической (X) и водородной (H) составляющих во флуоресцентное связывание исследуемого красителя с ДНК вещества анализировали в соответствующих буферах.

Так как недавно было показано, что возрастанию свечения потенциально активных люминесцентных меток способствует неполярная природа их микроокружения [8, 16, 17], были исследованы также спектральные свойства этих соединений в изопропанолу.



На основании спектральных данных был проведен компьютерный расчет параметров комплексообразования исследованных соединений.

### Спектральные характеристики

Спектры поглощения исследуемых соединений в низкосолеовом буфере А\* при различных соотношениях концентраций краситель-субстрат представлены на рис. 1. Можно видеть, что при увеличении соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  от 0 до 200 для соединения (I) характерно монотонное уменьшение оптического поглощения и наличие одной изобестической точки при неизменном  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{полг}}$ , что свидетельствует о наличии одного типа связывания этого красителя с ДНК в данной области соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ . Вместе с тем у остальных соединений оптическое поглощение системы краситель—ДНК менялось неоднозначно. Сначала, по мере увеличения концентрации ДНК до  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 5-10$ , происходило уменьшение поглощения (А) в системе, сопровождавшееся сдвигом  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{полг}}$ , а затем, при  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 10-200$ , величина поглощения с увеличением  $C_{\text{ДНК}}$  возрастала при неизменном  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{полг}}$ .

Полученные нами результаты для красителей DAPI (IV) и Hoechst-33258 (VI) согласуются с данными работ [6, 7], где также было отмечено, что подобная неоднозначность поведения оптического поглощения системы при наличии двух изобестических точек свидетельствует о двух типах связывания лигандов с ДНК. При этом первый, «слабый», неспецифичный по отношению к субстрату, полностью определяется электростатической составляющей. Он исчезает в средах с высокой ионной силой и приводит лишь к небольшому уменьшению флуоресценции красителя при увеличении соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ . Второй имеет на порядок большие специфичность и сродство к субстрату, характеризуется наличием водородной составляющей в связывании с субстратом и приводит к значительному увеличению флуоресценции красителя при увеличении соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ .

Спектры люминесценции соединений (I)—(VI) в низкосолеовом буфере А при различных соотношениях концентраций ДНК—субстрат (рис. 2) демонстрируют, что у соединений (II)—(VI) при увеличении концентрации ДНК наблюдалось

\* Состав буферов — см. «Экспериментальную часть».

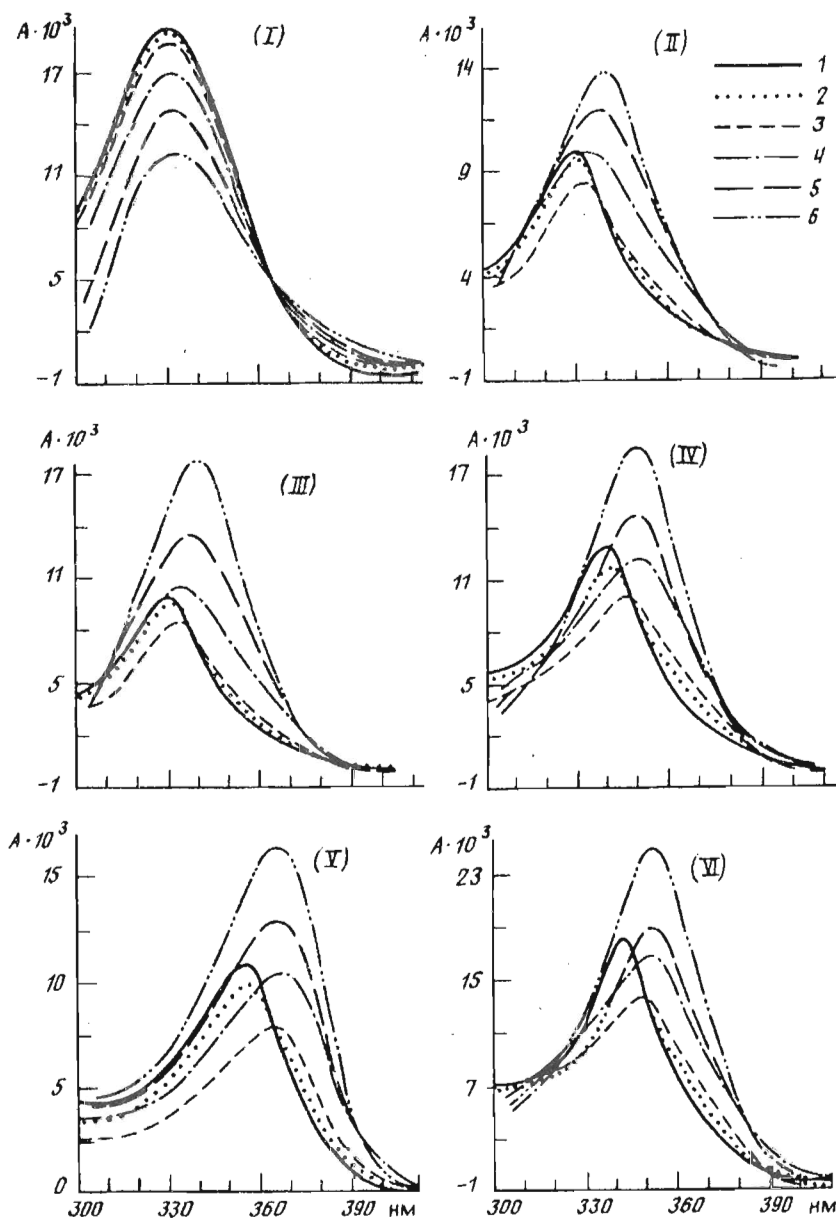


Рис. 1. Спектры поглощения соединений (I) — (VI) в буфере А. Соотношения концентраций ДНК/флуорофор: 0 (1), 3,5 (2), 10 (3), 50 (4), 100 (5), 200 (6).  $C_{\text{крас}} = 6,42 \cdot 10^{-7}$  М

монотонное увеличение интенсивности флуоресценции в системе ДНК—краситель, причем с довольно высоким относительным квантовым выходом  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_{\text{буф}}$ . Взаимодействие же с ДНК соединения (I) сопровождалось уменьшением флуоресценции.

Поведение соединений (II), (III) и (V) в буфере В с высокой ионной силой было аналогично ранее описанному, в частности в работах [6, 7] для Hoechst-33258 (VI) и DAPI (IV). Так, с увеличением соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  оптическое поглощение системы краситель—полинуклеотид монотонно уменьшалось при наличии единственной изобестической точки при длине волны  $\lambda_3$ ,

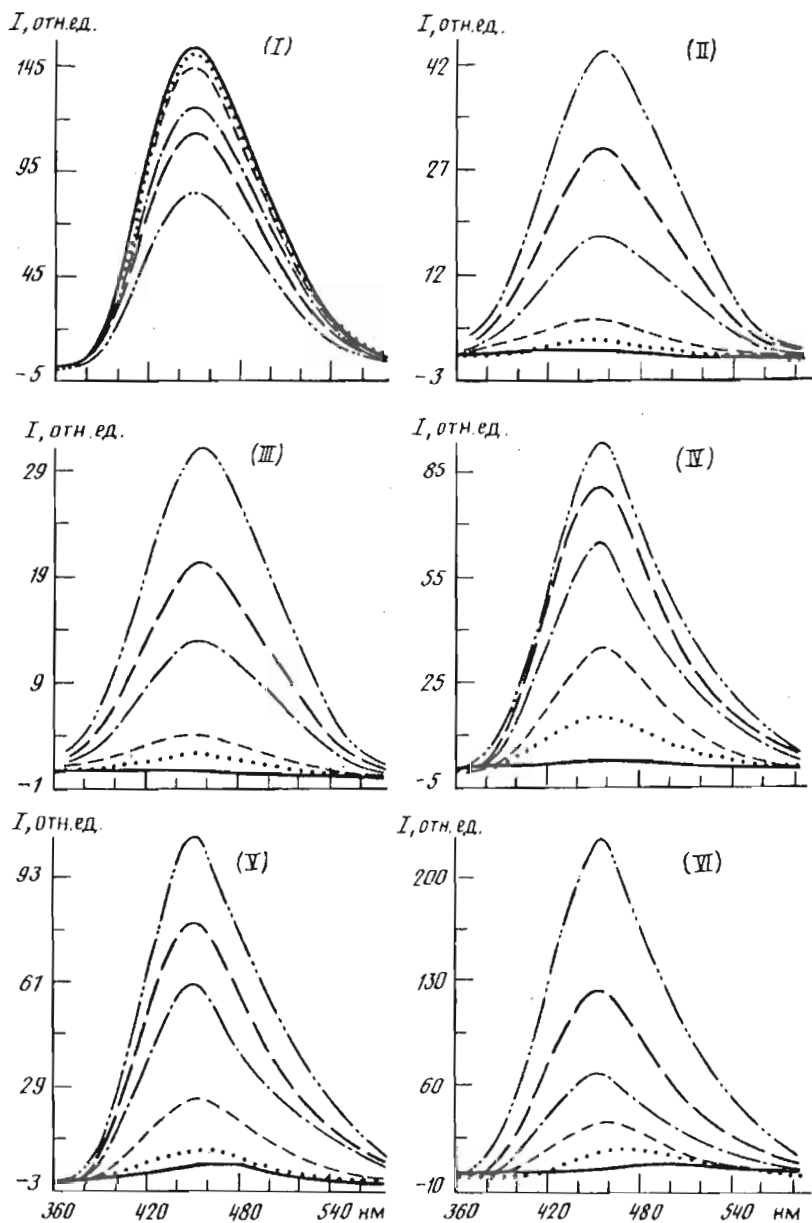


Рис. 2. Спектры флуоресцентной эмиссии соединений (I)–(VI) в буфере А. Условные обозначения те же, что и на рис. 1

промежуточной между длинами волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , наблюдавшимися для двух изобестических точек у данного соединения в буфере А (для DAPI, например, было зарегистрировано:  $\lambda_1 = 348$ ,  $\lambda_2 = 380$  и  $\lambda_3 = 360$  нм). Однако максимумы поглощения и флуоресценции у полностью связанного красителя совпадали с таковыми в буфере А. Интенсивность флуоресценции по-прежнему увеличивалась с добавлением ДНК, хотя и в меньшей степени, чем в буфере А. Также совпадали (с точностью  $\pm 10\%$ ) и параметры комплексообразования ( $K$  и  $n$ , см. ниже в примечании к таблице), вычисляемые по данным, полученным в двух этих буферах. Все это позволяет утверждать, что в буфере В с высокой ионной силой

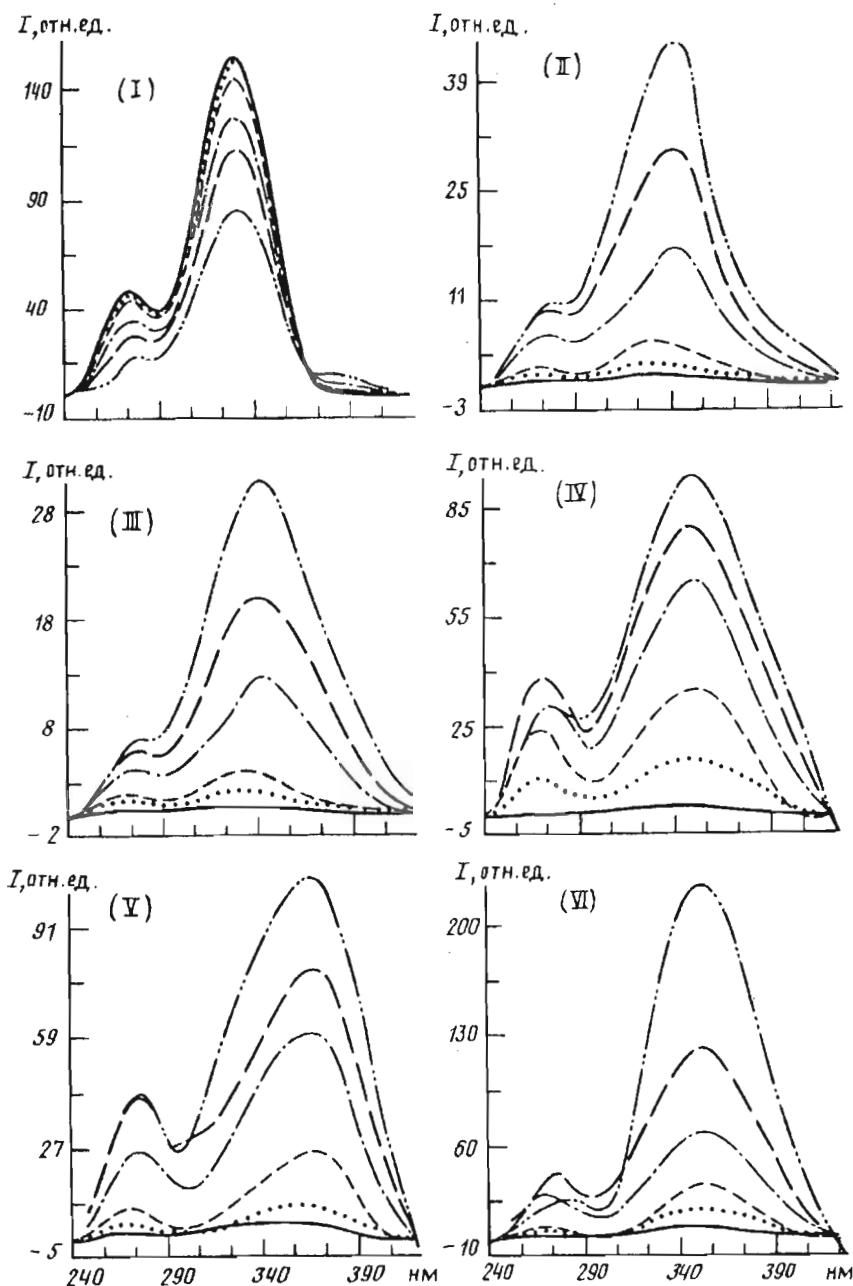


Рис. 3. Спектры флуоресцентного возбуждения соединений (I) — (VI) в буфере А. Условные обозначения те же, что и на рис. 1

у соединений (II) — (VI) превалировал второй, «сильный» тип связывания. При этом соотношение коэффициентов молярной экстинкции и флуоресценции полностью связанного и свободного красителей здесь изменилось по отношению к его значению в низкосолевом буфере А (очевидно, вследствие разного характера влияния изменения параметров окружения на соединение в этих двух отличных друг от друга состояниях). «Сильный» характер взаимодействия лигандов с субстратом в этом случае подтверждается также и данными других исследований,

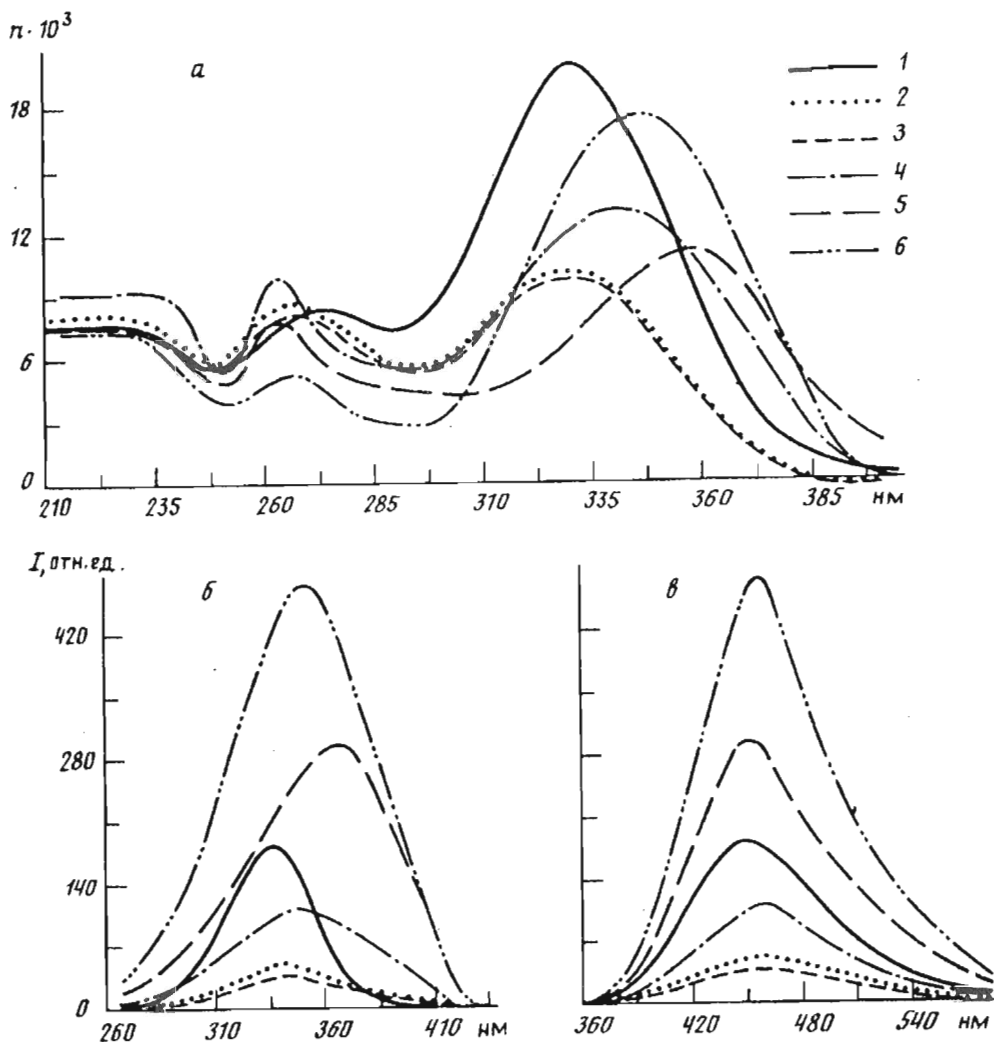


Рис. 4. Спектры поглощения чистых красителей в буфере А (а), а также флуоресцентного возбуждения (б) и эмиссии (в) в изопропаноле. Условные обозначения: кривым 1—6 соответствуют соединения (I)—(VI)

в которых, в частности, использовались иные, альтернативные методы определения характера взаимодействия в подобных системах (поскольку флуориметрия и оптическая спектроскопия представляют собой лишь часть из общего набора методов, позволяющих делать достаточно достоверные заключения о наличии и характере взаимодействия в исследуемой системе) [1, 7, 18—20]. У соединения же (I) спектральные характеристики в буфере В при взаимодействии с ДНК практически не изменялись, что свидетельствовало о практически полностью электростатическом характере его взаимодействия с полинуклеотидами.

В буфере Б, содержащем 4 М мочевины, поведение исследуемых соединений при взаимодействии с ДНК было аналогично таковому в буфере А, только с меньшей амплитудой изменения интенсивности флуоресценции (I) и оптического поглощения (A) системы. По-видимому, это имело место вследствие того, что водородная составляющая не являлась здесь лимитирующей ни для одного из типов связывания исследуемых красителей с субстратом. Исключение составило соединение (V), у которого квантовый выход (а соответственно, и интенсивность

флуоресценции, и в особенности оптическое поглощение) при добавлении ДНК практически не изменялся ( $\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_{\text{буф}} = 3,3$ ), тогда как максимумы поглощения и флуоресцентной эмиссии изменялись в той же мере, как и в буфере А (но при больших соотношениях концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ ). Вклад водородных связей в «сильный» тип связывания у него являлся основным и составил 90%.

Спектры люминесцентного возбуждения исследуемых соединений в буфере А при тех же соотношениях концентраций ДНК—краситель, что и на предыдущих рисунках, представлены на рис. 3. У всех исследованных красителей при одном максимуме эмиссии имеются два пика возбуждения: длинноволновый, с максимумом в области 330—367 нм, и коротковолновый, с максимумом в области 265—275 нм. На спектрах поглощения максимум их коротковолнового пика совпадает с максимумом поглощения ДНК, но на спектрах, снятых для чистых красителей (см. рис. 4 а), он также отчетливо различим.

Поведение двух этих пиков с изменением соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  в системе было различно. Так, уже начиная от величины  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 100$  флуоресценция системы ДНК—краситель при ее коротковолновом возбуждении либо практически переставала изменяться с увеличением концентрации ДНК, как у соединений (II), (III) и (V), либо, как у соединений (IV) и (VI), даже начинала уменьшаться. У DAPI это снижение начиналось уже при значении  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 50$ . Причиной этого не может быть эффект экранирования флуоресценции в данной области спектра за счет ДНК, поскольку ее поглощение, даже при наиболее высоких используемых нами соотношениях концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ , в области коротковолнового максимума возбуждения исследуемых красителей не превышало 0,2 ОЕ. При длинноволновом же возбуждении флуоресценция системы продолжала увеличиваться. В буфере В с высокой ионной силой у соединений (II) и (III) (для которых в связывании с ДНК значительно преобладала электростатическая составляющая) снижение флуоресценции с увеличением концентрации ДНК при ее коротковолновом возбуждении наблюдалось во всем диапазоне соотношений концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 0—200$ , так же как и у соединения (I) (имеющего  $X = 94\%$ ), флуоресценция которого при длинноволновом возбуждении практически не изменялась.

В спирте коротковолновый пик возбуждения у всех исследуемых соединений вообще пропадал. Возможно, это связано с увеличением гидрофобного взаимодействия молекул красителя с микроокружением. Так, феномен влияния гидрофобного взаимодействия на изменения в данной области спектра ( $\lambda$  240—290 нм) для веществ другого класса был отмечен недавно в работе [21].

В определенных условиях учет такой, более сложной, чем рассматривалось ранее, структуры спектров исследуемых соединений может, очевидно, оказаться полезным как для анализа механизмов взаимодействия, так и для повышения чувствительности определения полинуклеотидов с помощью рассматриваемого красителя. Так, в частности, в работе [22] при анализе взаимодействия РНК с красителем DAPI (IV) (активно флуоресцирующего комплекса при этом не образуется) использовались изменения по обоим даваемым этим красителем максимумам поглощения.

Данные, полученные при снятии спектральных характеристик исследуемых красителей в спирте (рис. 4б, в), подтверждают ранее высказанное предположение о том, что в изопропанолe (который имеет  $\epsilon$  20,1) молекула красителя находится в условиях микроокружения, подобных условиям, которые создаются для нее в узкой бороздке ДНК [8, 9]. При этом изменение свечения свободного красителя по отношению к его свечению в водных растворах достаточно хорошо согласуется с его «поведением» в случае максимально возможного соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  при длинноволновом возбуждении системы при условии, что это соединение реагирует с ДНК с увеличением своей флуоресценции и имеет «внешний» тип связывания с ним (см. рис. 2—4, таблица).



## Спектральные и комплексообразующие параметры ДНК-лигандов

Флуорохром	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)
$\lambda_0^{\text{фл}}$ , нм	450	455	455	455	467	500
$\lambda_0^{\text{возб}}$ , нм	330	330	330	340	354	345
$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$ , нм	450	455	455	455	452	455
$\lambda_{\text{макс}}^{\text{возб}}$ , нм	330	340	340	350	367	353
$(\lambda_0^{\text{возб}})^*$ , нм	275	270	270	265	265	267
$(\lambda_{\text{макс}}^{\text{возб}})^*$ , нм	275	275	275	275	275	282
$\lambda_{\text{сп}}^{\text{фл}}$ , нм	430	458	458	460	455	458
$\lambda_{\text{сп}}^{\text{возб}}$ , нм	335	340	340	350	367	353
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$ , л · моль <sup>-1</sup> · см <sup>-1</sup>	31,1	15,9	5,2	20,2	17,1	27,3
$\varepsilon^* \cdot 10^{-3}$ , л · моль <sup>-1</sup> · см <sup>-1</sup>	13,1	13,3	12,4	15,2	12,1	8,1
$\mu \cdot 10^{-6}$ , отн.ед. · л · моль <sup>-1</sup>	241,0	2,3	1,2	4,0	8,7	11,7
$\mu^* \cdot 10^{-6}$ , отн.ед. · л · моль <sup>-1</sup>	74,0	1,4	0,8	2,0	4,4	3,4
$(\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_0)_A$	0,55	21,60	23,40	27,10	35,40	41,60
$(\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_0)_B$	0,56	18,00	18,10	16,00	3,30	18,20
$(\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_0)_B$	1,00	2,98	4,30	10,20	32,10	21,90
$\varphi_{\text{сп}}/\varphi_0$	1,06	20,60	21,50	25,10	32,40	38,50
H, %	0	5	11	36	90	52
X, %	94	81	75	55	7	43
$K \cdot 10^{-6}$	13,60	7,76	7,88	4,90	8,42	8,90
$n \cdot 10^3$	4,06	6,48	6,62	26,00	6,85	4,55
$\eta_1 \cdot 10^{-6}$ , отн.ед. · л · моль <sup>-1</sup>	-1,56	0,54	0,73	5,95	1,45	4,36
$\eta_{10} \cdot 10^{-6}$ , отн.ед. · л · моль <sup>-1</sup>	-1,56	0,72	0,43	4,67	3,59	3,78
$\eta_{100} \cdot 10^{-6}$ , отн.ед. · л · моль <sup>-1</sup>	-0,39	0,39	0,23	0,50	0,59	1,69

Примечания:  $\lambda_0^{\text{возб}}$  и  $\lambda_0^{\text{фл}}$  — длины волны максимумов возбуждения (по длинноволновому пику) и флуоресценции для чистых красителей;  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{возб}}$  и  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$  — длины волн максимумов возбуждения и флуоресценции при соотношении молярных концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 200$ ;  $(\lambda_0^{\text{возб}})^*$  и  $(\lambda_{\text{макс}}^{\text{возб}})^*$  — длины волн максимумов возбуждения при коротковолновом максимуме в буфере А при соотношениях молярных концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 0$  и 200 соответственно;  $\lambda_{\text{сп}}^{\text{возб}}$  и  $\lambda_{\text{сп}}^{\text{фл}}$  — длины волн максимумов возбуждения и флуоресценции чистых красителей в изопропанол (коротковолновый пик возбуждения здесь отсутствует);  $\varepsilon$  и  $\varepsilon^*$  — коэффициенты молярной экстинкции для чистого красителя в буфере А по длинн- и коротковолновому максимумам поглощения соответственно;  $\mu$  и  $\mu^* = I_0/C_{\text{крас}}$  — коэффициенты молярной флуоресценции чистого красителя в буфере А при длинноволновом и коротковолновом максимумах возбуждения соответственно;  $(\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_0)_A$ ,  $(\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_0)_B$  и  $(\varphi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\varphi_0)_B$  — относительные квантовые выходы исследуемых красителей при максимальном соотношении концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  в буферах А, Б и В;  $\varphi_{\text{сп}}/\varphi_0$  — отношение квантовых выходов для чистого красителя в изопропанол и буфере А; H и X — вклад водородной и электростатической составляющих в связывание исследуемого красителя с ДНК; K — кажущаяся константа связывания; n — число мест связывания в расчете на одну пару оснований;  $\eta_1$ ,  $\eta_{10}$  и  $\eta_{100}$  — коэффициенты чувствительности исследуемых красителей по отношению к ДНК в буфере А при соотношениях молярных концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 1, 10$  и 100.

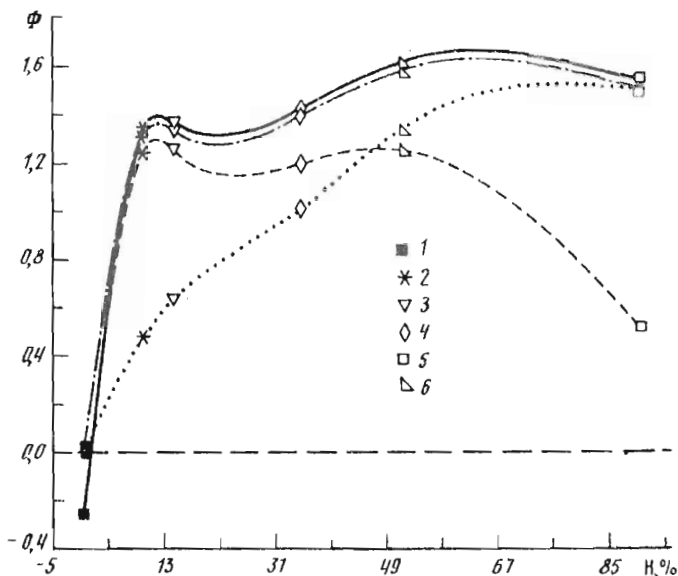


Рис. 5. Зависимость между максимальным относительным квантовым выходом исследуемых красителей в присутствии ДНК ( $\Phi = \lg \{ \Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}} / \Phi_0 \}$ ) и величиной вклада в их связывание с полинуклеотидом водородной составляющей (Н). Условные обозначения: кривые 1—3 (обозначения кривых см. на рис. 1) приведены для буферов А, Б и В соответственно. Кривая 4 показывает величину квантового выхода чистых красителей в изопропанолe по отношению к их квантовому выходу в буфере А ( $\lg \{ \Phi_{\text{сн}} / \Phi_0 \}$ ). Штриховая прямая 5 — нулевой уровень  $\Phi$ . Точками 1—6 показаны данные для соединений (I)—(VI) соответственно

### Параметры связывания

Основные спектральные и комплексообразующие параметры, определенные нами для соединений (I)—(VI) (см. таблицу) свидетельствуют, что сумма вкладов водородной (Н) и электростатической (Х) составляющих во флуоресцентное связывание с ДНК для всех рассматриваемых соединений близка к 100% (это заключение согласуется с результатами, полученными другими исследователями, — см., например, [6, 7]). Соотношение между Н- и Х-составляющими, однако, существенно изменяется в зависимости от характера терминальных группировок и структуры «ядра» молекулы красителя. При этом электростатические силы обеспечивают для молекул красителя специфичность взаимодействия с полинуклеотидами и сродство к субстрату того же порядка, что и водородные. Так, соединение (I), имеющее 94% электростатических связей и 0% водородных и реагирующее с ДНК с уменьшением флуоресценции, обнаруживает наибольшую специфичность и сродство к субстрату в ряду исследуемых соединений ( $K = 13,60 \cdot 10^6$ ,  $n = 4,06 \cdot 10^{-3}$ ), а производное DAPI (IV), имеющее 55,2% ионных связей и 35,5% водородных, — наименьшие ( $K = 4,90 \cdot 10^6$ ,  $n = 26,00 \cdot 10^{-3}$ ).

Величина относительного квантового выхода  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}} / \Phi_{\text{буф}}$  исследованных соединений (см. рис. 5 и таблицу), резко возрастая уже при небольшом удельном весе водородных связей (Н < 5%), в дальнейшем, с увеличением доли такого связывания, изменялась мало и зависела скорее от структуры молекулы красителя, чем от характера его взаимодействия с ДНК. Вместе с тем в средах с высокой ионной силой, где ингибируются электростатические связи молекул красителя с субстратом, эта зависимость становится достаточно близкой к линейной.

С практической точки зрения большую информацию о способности красителя быть хорошим флуорофором на ДНК дает значение  $\eta$  (коэффициент флуоресцентной чувствительности исследуемого лиганда по отношению к данному субстрату) и характер его зависимости от соотношения концентраций  $C_{\text{ДНК}} / C_{\text{крас}}$ . Эти данные представлены на рис. 6, из которого, в частности, можно видеть,

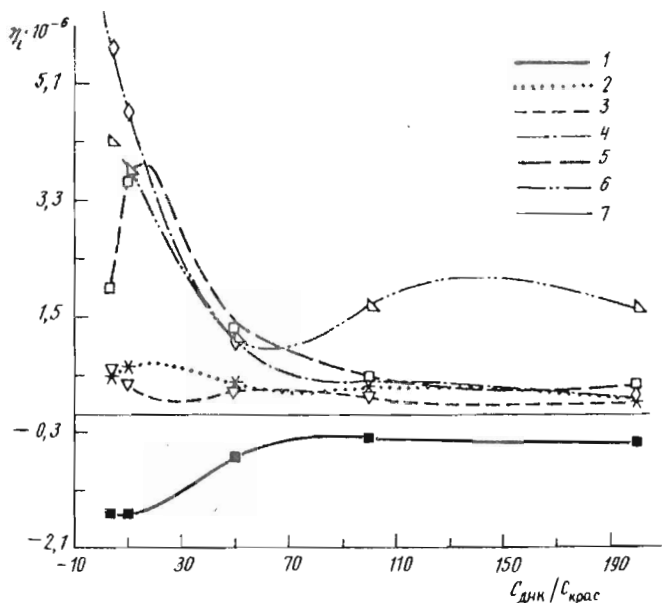


Рис. 6. Зависимость величины коэффициентов чувствительности  $\eta_i$  исследуемых соединений от изменения соотношения концентраций ДНК/краситель в системе. Условные обозначения: кривые 1—6 соответствуют соединениям (I)—(VI). Прямая 7 показывает нулевой уровень чувствительности. Обозначения для точек те же, что и на рис. 5

что наибольшей чувствительностью к данному типу ДНК в ряду исследуемых соединений обладает DAPI (IV) при  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 1-20$ . Соединения же (II) и (III), имеющие достаточно близкие к нему величины  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_{\text{буф}}$  (см. таблицу), отличаются чрезвычайно малыми величинами  $\eta_i$ , меньшими даже, чем у соединения (I) (в абсолютном выражении, т. е.  $|\eta_i|$ ), причем, если при больших значениях  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  величина  $\eta$  еще в определенной мере согласуется со значением  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_{\text{буф}}$  для данного красителя, то при малых соотношениях  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$  (которые представляют больший интерес, так как при них величина  $\eta_i$  для данного красителя наибольшая) эти величины не являются взаимосвязанными (см. рис. 7в, е и таблицу). Из таблицы, в частности, видно, что если о величине  $\eta_i$  для рассматриваемых красителей по значению  $(\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_{\text{буф}})_A$  судить ни в коей мере нельзя, то о величине  $\eta_{100}$  в определенной степени можно. Так, с увеличением максимального относительного квантового выхода у исследуемых красителей увеличивается в целом и значение  $\eta_{100}$ , а при близких  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_{\text{буф}}$  близки и  $\eta_{100}$ , тогда как изменение  $\eta_i$  у них совершенно не зависит от изменения  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_{\text{буф}}$ .

Чувствительность данного красителя по отношению к субстрату в большей мере зависит от параметров его комплексообразования (см. рис. 7а, з) и величины вклада водородной составляющей в его связывание с полинуклеотидом (рис. 7б, д). Стабильность величины  $\eta$  при изменении соотношения  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ , характеризующая степень нелинейности зависимости концентрации ДНК от интенсивности флуоресценции красителя в ее присутствии, непосредственно используемой для анализа нуклеиновых кислот с помощью данного красителя, также имеет немалое значение.

Графики зависимости между спектральными и комплексообразующими свойствами исследуемых соединений (рис. 8) демонстрируют следующую закономерность: увеличение сродства к субстрату сопровождалось увеличением специфичности (величины, обратной к  $n$ ) (рис. 8а). Однако в большинстве случаев

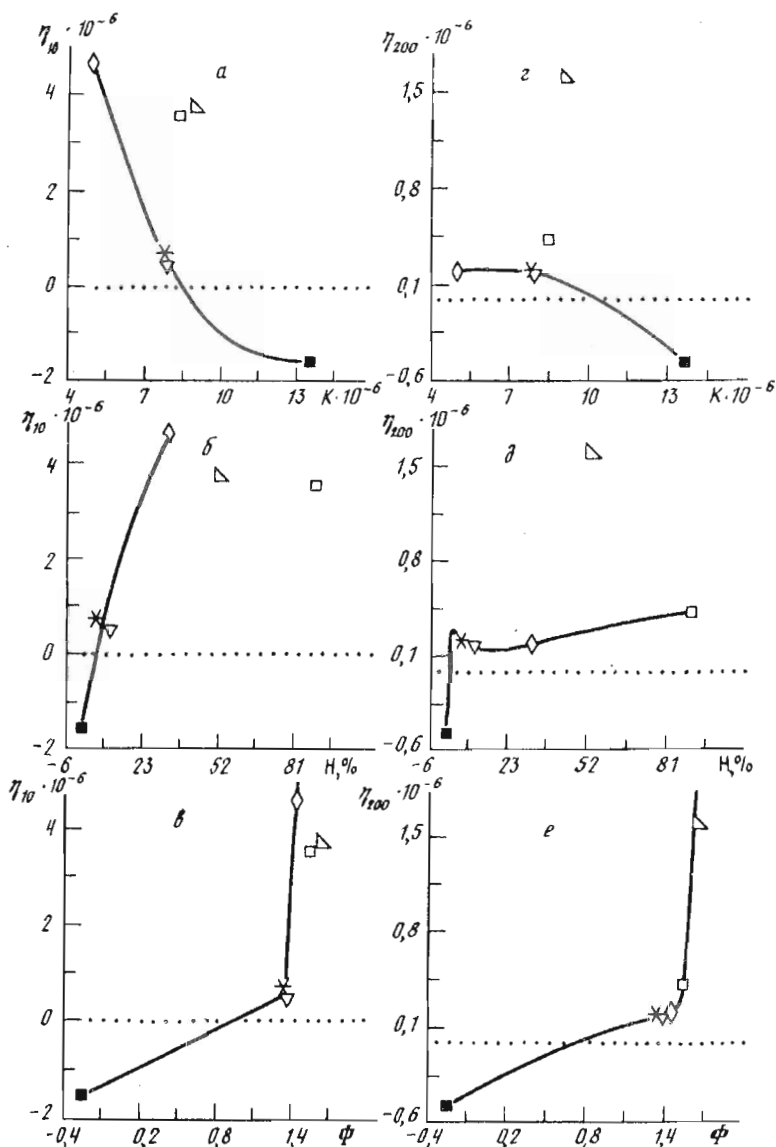


Рис. 7. Зависимость коэффициентов чувствительности  $\eta_i$  исследуемых соединений от спектральных и комплексообразующих параметров системы ДНК—краситель. а—в — зависимости для  $\eta_i$  при соотношении концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 10$ , з—е — при  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 200$ . Пунктирная линия соответствует нулевому уровню чувствительности. Обозначения для точек те же, что и на рис. 5

результаты, полученные для соединений (V) и (VI), не согласовывались с зависимостями, характерными для соединений (I)—(IV) (рис. 8б, д). Это свидетельствовало о том, что по характеру комплексообразования с ДНК соединение DIP1 (V), имеющее в составе своей молекулы в единой сопряженной системе три гетероцикла, обуславливающие преимущественно водородное (как и в случае соединения (VI), но в еще более ярко выраженном виде) ее специфическое связывание в системе ДНК—краситель, ближе к бис-, чем к монопроизводным, рассматриваемым в настоящей работе.

Для моносоединений (I)—(IV) следует также отметить общую тенденцию к уменьшению относительного квантового выхода  $\Phi_{\text{ДНК}}^{\text{макс}}/\Phi_0$  и коэффициентов чув-

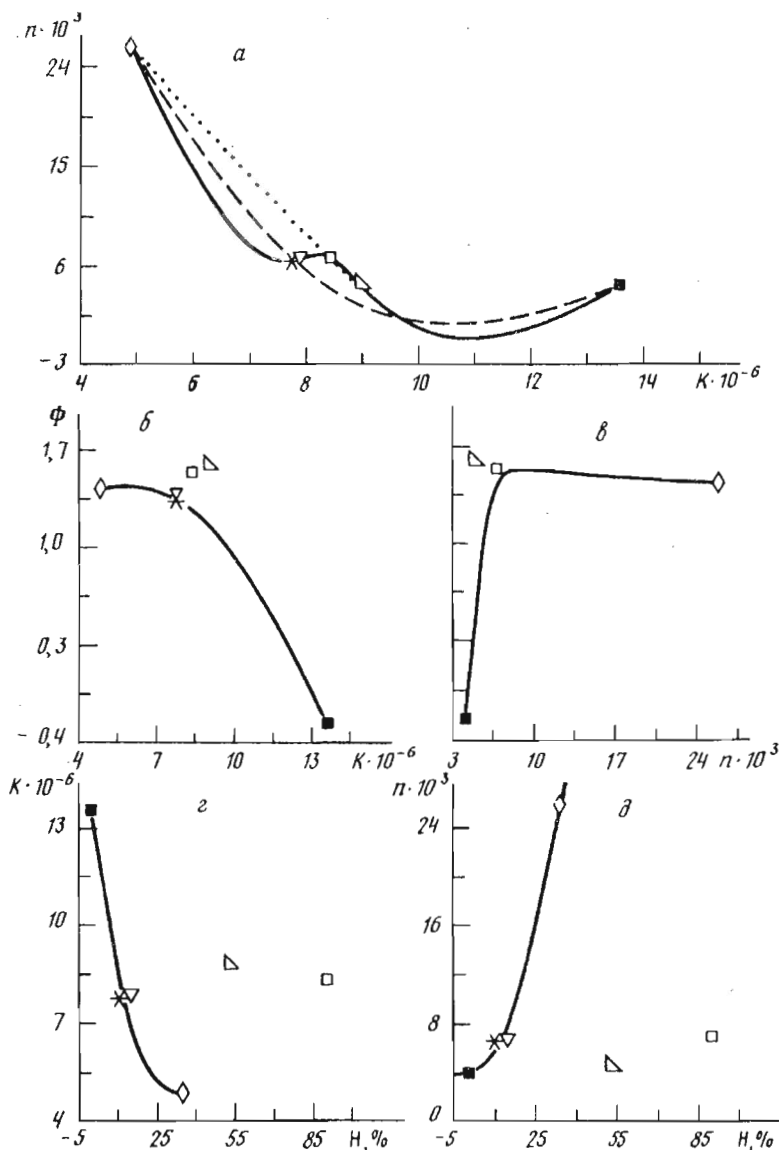


Рис. 8. Зависимость между спектральными и комплексообразующими параметрами системы ДНК—краситель. На рис. а кривая 1 обобщает данные для всех шести соединений, 2 соответствует только моносоединениям (I)—(IV), 3 выделяет линейную зависимость между  $K$  и  $n$ , характерную для соединений (IV)—(VI) (обозначения кривых см. на рис. б). На рис. б—д представлены зависимости между логарифмом максимального относительного квантового выхода в присутствии ДНК ( $\Phi$ ) (б, в), долей водородных связей в системе ДНК—лиганд ( $H$ ) (г, д) и параметрами комплексообразования ( $K$  и  $n$ ) только для моносоединений (I)—(IV). Обозначения для точек те же, что и на рис. 5

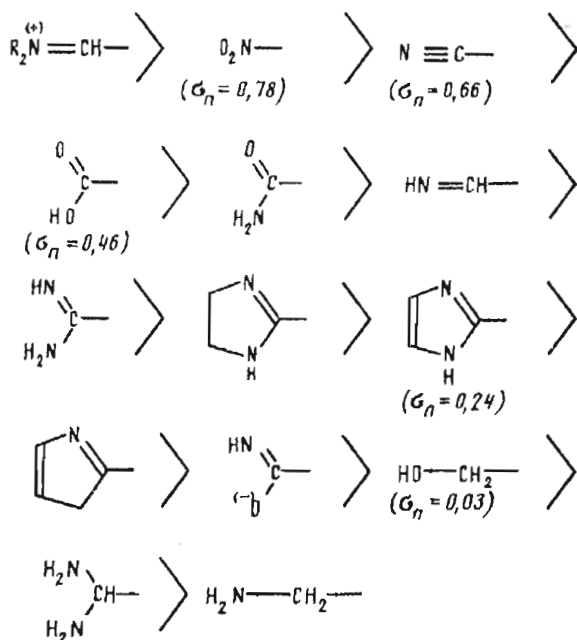
ствительности по отношению к ДНК  $\eta_i$  с увеличением константы связывания ( $K$ ) (рис. 7а, д и 8б). С увеличением вклада в связывание с ДНК Н-составляющей константа связывания (а соответственно и специфичность) у этих соединений уменьшалась (рис. 8 г, д). Начальные коэффициенты чувствительности ( $\eta_{11}$ ,  $\eta_{10}$ ) при этом увеличивались. Для конечных же ( $\eta_{100}$ ,  $\eta_{200}$ ) зависимость от доли водородных связей напоминала рассмотренную ранее для величины  $\Phi$  (рис. 5), т. е., резко возрастающая уже при небольшом удельном весе водородных связей,  $\eta$  в дальнейшем изменялся мало.

В целом можно заметить, что соединение DAPI (IV), имеющее аномально низкие в ряду исследуемых соединений сродство к субстрату и специфичность к А · Т-парам нуклеотидов, имеет и наибольшую чувствительность по отношению к ДНК.

В работах [8, 9, 14] уже высказывалось положение, подтверждаемое и настоящим исследованием: чтобы быть эффективным флуорофором для нуклеиновых кислот, соединение должно иметь достаточно низкую величину собственной флуоресценции и возможность восстанавливать способность к интенсивному свечению при специфическом взаимодействии с определенными субстратами.

У исследованных моносоединений этот эффект достигается за счет того, что помимо способного к активной флуоресценции «ядра» их молекулы должны содержать также электроноакцепторные терминальные группы (как в случае соединений (II) — (V)), подавляющие его свечение в свободном состоянии молекулы красителя. При этом как «ядро», так и эти терминальные группы должны быть способны к специфическому взаимодействию с определенными последовательностями в полинуклеотидах с тем, чтобы иметь возможность получать от них недостающую электронную плотность, вследствие чего в связанном состоянии у молекулы красителя способность к интенсивной флуоресценции будет восстанавливаться. Однако если терминальные группы, как в случае соединения (III), или по крайней мере одна из них, как в случае соединения (II), слишком сильно подавляют свечение «ядра» красителя, то даже при достаточно большой величине относительного квантового выхода флуоресценции в присутствии ДНК  $\Phi_{\text{ДНК}}/\Phi_0$  соединение будет иметь малую чувствительность по отношению к полинуклеотидам и соответственно будет малоприспособно для их количественного определения. Следовательно, адекватность ядру электроноакцепторных свойств терминальных радикалов должна иметь большое значение.

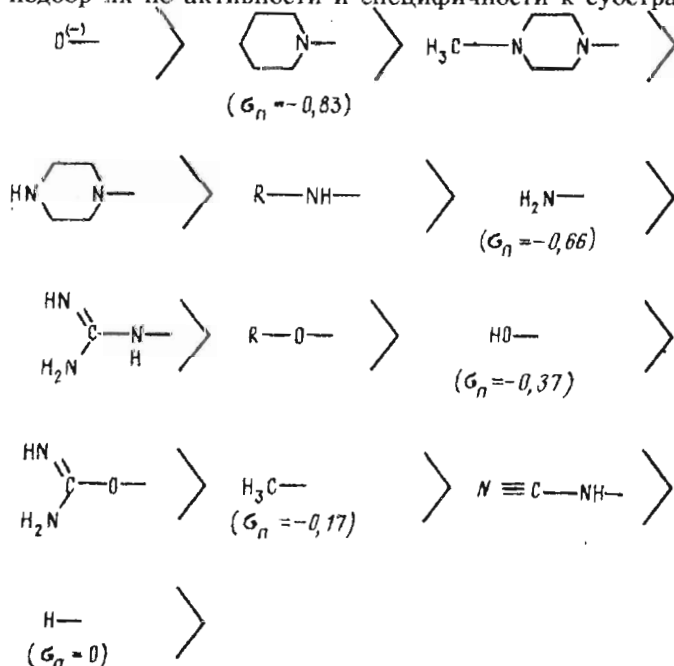
Для таких электроноакцепторных групп, способных взаимодействовать с полинуклеотидами, на основании уже имеющихся в наличии экспериментальных данных (работы [4, 6—9, 14] и результаты настоящей статьи), а также теории донорно-акцепторных заместителей [23—27] можно предложить следующий ряд, построенный по убыванию активности входящих в него групп, где  $\sigma_n$  — константы Гаммета, отражающие влияние заместителя на электронную плотность «ядра» соединения:



При построении этого ряда учитывались как эмпирические данные об относительной электроакцепторной активности различных групп и возможности их применения (в частности, исходя из стерического соответствия) для создания красителей, специфически взаимодействующих с полинуклеотидами, так и чисто теоретические. В частности, известно, что более электроотрицательные атомы, связанные с углеводородными радикалами, оттягивают от них электронную плотность, причем атом кислорода способен к этому в большей степени, чем атом азота.  $\pi$ -электроны сдвигаются в большей степени, чем  $n$ -, а последние — лучше, чем  $\sigma$ -. Чем больше возможность делокализации заряда, тем меньше электроакцепторная активность группы. Если у атома азота или кислорода есть возможность оттягивать электронную плотность не только от «ядра», но еще и от какого-либо другого радикала, то его электроакцепторная активность по отношению к «ядру» также уменьшается и т. д.

Используя в синтезируемых соединениях различные терминальные группы из этого ряда, можно осуществлять адекватное согласование их с активностью способного к флуоресценции «ядра». Так, для  $\pi$ -избыточного фенилиндольного «ядра», как в случае соединений (IV) и (V), оптимальными (исходя из наибольшей величины коэффициента чувствительности  $\eta$  для соединения при его взаимодействии с ДНК) оказываются амидиновые группы (см. таблицу). Вместе с тем для бензимидазольного «ядра», обладающего  $\pi$ -амфотерными свойствами [28], они, очевидно, являются слишком сильными акцепторами, и в этом случае для создания хорошего флуорофора в качестве терминальных, вероятно, следует брать менее активные группы из вышеприведенного ряда.

В случае соединений, содержащих два «ядра», входящих в единую сопряженную систему (если способные к активной флуоресценции «ядра» в бис-соединении не входят в такую систему, то к нему применимы все выводы, сделанные ранее для моносоединений), представленных в данной работе красителем Hoechst-33258 (VI), «ядра» уже взаимно ингибируют свечение друг друга. Поэтому, чтобы не подавить полностью флуоресценцию красителя, в качестве терминальных целесообразно использовать электронодонорные группировки. Но и тогда требуется оптимальный подбор их по активности и специфичности к субстрату. Исходя из



вышеприведенных работ здесь может быть предложен следующий ряд, построенный по убыванию электронодонорной активности входящих в него групп:

Начинает его группа, имеющая наибольший отрицательный заряд и, следовательно, в наибольшей степени способная отдавать электронную плотность связанному с ней «ядру» соединения. Атом азота, имеющий неподеленную электронную пару, также способен отдавать ее связанному с ним ароматическому кольцу, причем в большей степени, чем атом кислорода. При этом, если у него есть возможность компенсировать отдаваемую электронную плотность, например, за счет следующих за ним радикалов, его электронодонорная способность усиливается. В случае, если такие радикалы, наоборот, отбирают на себя часть электронной плотности, соответствующая электронодонорная способность атома с неподеленной электронной парой, непосредственно связанного с ароматическим кольцом, уменьшается. Исходя из подобных соображений, а также уже известных данных об относительной электронодонорной активности определенных групп и возможности их взаимодействия или по крайней мере стерического соответствия определенным нуклеотидным структурам и был построен этот ряд.

В случае, если подавление свечения «ядер» у бис-соединения мало, нужно использовать электроноакцепторные терминальные группы из предложенного выше ряда (схема 2).

В заключение следует отметить, что на результаты применения того или иного красителя в качестве флуорофора для ДНК в значительной мере оказывают влияние также параметры среды, в которой проводятся измерения. Так, для любой из рассматриваемых систем краситель—субстрат существует оптимальный диапазон температур и значений pH. Важное значение имеет состав среды (так, как мы уже говорили, присутствие в среде мочевины при низкой ионной силе раствора ингибирует образование водородных связей между ДНК и исследуемым красителем, при этом меняются и статические, и динамические характеристики флуоресценции данной системы), ее диэлектрическая проницаемость (это видно из сопоставления данных, полученных для исследованных красителей в водных средах и в спирте (см. таблицу и рис. 4)), ионная сила (так, в средах с высокой ионной силой очевидное преимущество получают красители, образующие с субстратом главным образом водородные связи (рис. 5)). Поэтому необходимо подбирать эти параметры оптимальными для каждой конкретной системы ДНК—краситель. В случае, если методика определения более жестко диктует состав среды, следует, наоборот, выбирать наиболее оптимальный (по чувствительности, специфичности, стабильности и т. д.) для данных условий краситель.

### Экспериментальная часть

Синтез соединения (I) описан ранее [29]. Соединения (II) и (III) были синтезированы на кафедре молекулярной биотехнологии ЛТИ им. Ленсовета. Коммерческие флуорофоры (IV)—(VI) (DAPI, DIP1 и Hoechst-33258 соответственно) были получены от фирмы Serva (ФРГ). В качестве субстрата использовалась ДНК тимуса теленка фирмы Serva (ФРГ) (58% А · Т-пар; средняя молекулярная масса на один нуклеотид, использовавшаяся при вычислении молярных соотношений концентраций  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}}$ , 326 о.е.м.; коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [7]), предварительно обработанная для гомогенизации и уменьшения светорассеяния ультразвуком на аппарате УЗДН-2 в течение 15 с при силе тока 0,3 А на резонансной частоте 22 кГц (при этом средняя масса молекулы ДНК составила 3500 Да).

Все измерения проводились при постоянной величине  $C_{\text{крас}} = 6,42 \cdot 10^{-7} \text{ М}$  и различных значениях  $C_{\text{ДНК}}$  (М) при 20—25° С. Чтобы избежать эффектов разбавления, к «нулевому» раствору, содержащему буфер с красителем заданной концентрации, добавляли аликвоты (по 0,02 мл) раствора, содержащего тот же буфер, краситель заданной концентрации и ДНК в такой концентрации, чтобы



обеспечить в этом растворе соотношение  $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = 200$  моль/моль. Спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре фирмы Вексман (Австрия), модель 35. Флуоресценцию проб анализировали на спектрофлуориметре фирмы Hitachi (Япония), модель 850. При записи спектров на флуориметре щели монохроматоров возбуждения и эмиссии устанавливали по 3 нм, скорость сканирования — 120 нм/мин, время отклика — 2 с, усиление ФЭУ — нормальное. Запись спектров возбуждения проводили при  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$ , а спектров эмиссии — при  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{возб}}$ .

Так как перекрывание спектров поглощения и флуоресценции у исследуемых соединений практически отсутствовало, расчет соотношения квантовых выходов  $\Phi_{\text{ДНК}}/\Phi_{\text{буф}}$  осуществляли исходя из максимумов величин поглощения и флуоресценции соединений при соответствующих длинах волн (см., например, формулу  $I_2/I_1 = (\varphi_2/\varphi_1) \cdot (D_2/D_1)$  [30]). Спектры флуоресценции корректировались с использованием счетчика квантов на основе стандартного спиртового раствора родамина В.

Вещества анализировались в буферах следующего состава: 0,01 М NaCl, 0,01 М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  и 0,01 М трис (рН 7,4) (А); тот же буфер А, содержащий дополнительно 4 М мочевины (рН 7,6) (Б) и 2 М NaCl, 0,1 М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,01 М трис (рН 8,0) (В).

Вклад электростатической (Х) и водородной (Н) составляющих во флуоресцентное связывание исследуемого красителя с ДНК определяли по следующим формулам:

$$X = (\varphi^1/\varphi_0^1 - 1)/(\varphi/\varphi_0 - 1) \cdot 100\%,$$

$$H = (\varphi^2/\varphi_0^2 - 1)/(\varphi/\varphi_0 - 1) \cdot 100\%,$$

где  $\varphi/\varphi_0$ ,  $\varphi^1/\varphi_0^1$  и  $\varphi^2/\varphi_0^2$  — максимальные относительные квантовые выходы в присутствии ДНК для данного красителя в буферах А, Б и В соответственно.

Вычислялись также коэффициенты чувствительности:

$$\eta_s = (I_{s+1} - I_{s-1})/(2 \cdot C_{\text{крас}}),$$

непосредственно характеризующие возможности практического использования данного красителя для флуоресцентного определения ДНК в заданном диапазоне концентраций полинуклеотида ( $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{крас}} = (S - 1) - (S + 1)$ ).

Параметры комплексообразования ( $K = C_{\text{ДНК}}^{\text{связ}}/(C_{\text{ДНК}}^{\text{своб}} \cdot C_{\text{крас}}^{\text{своб}})$  — кажущаяся константа связывания и  $n = C_{\text{крас}}^{\text{связ}}/C_{\text{ДНК}}^{\text{связ}}$  — число мест связывания в расчете на одну пару оснований) определяли из уравнения Скэтчарда:

$$r/m = K \cdot (n - r)$$

(см. работы [6, 7, 31]), в области, допустимой для его применения. Здесь  $r = C_{\text{крас}}^{\text{связ}}/C_{\text{ДНК}}$ ,  $m = C_{\text{крас}}^{\text{своб}}(M)$ ,  $C_{\text{крас}}^{\text{своб}} = C_{\text{крас}} - C_{\text{крас}}^{\text{связ}}$ , а  $C_{\text{крас}}^{\text{связ}} = (I_s - I_0)/(I_{\text{макс}} - I_0) \cdot C_{\text{крас}}$ .

Максимальное значение интенсивности флуоресценции ( $I_{\text{макс}}$ ) и оптического поглощения ( $A_{\text{макс}}$ ) комплекса краситель—ДНК определяли путем экстраполяции зависимостей  $I$  и  $A$  от  $C_{\text{крас}}/C_{\text{ДНК}}$  к значению  $C_{\text{крас}}/C_{\text{ДНК}} = 0$ .

Для построения графических зависимостей (рис. 5—8) использовалась, с некоторыми очевидными ограничениями, глобальная сплайн-интерполяция полученных экспериментальным путем данных для отдельных соединений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zimmer C., Wahnert U.//Prog. Molec. Biol. 1986. V. 47. № 1. P. 31—112.
2. Latt S., Marino M., Lalande M.//Cytometry. 1984. V. 5. № 2. P. 339—347.
3. Baegens W., Fattan A. F., De Moerloose P.//Anal. Lett. 1985. V. 18. № 17. P. 2143—2154.
4. Рослов А. А. Исследование специфичных лигандов ДНК бензимидазольного ряда: Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1989. 142 с.
5. Лейнсоо Т. А., Николаев В. А., Гроховский С. Л.//Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1616—1637.
6. Колосова О. Ю. Флуоресцентные ДНК-зонды в ряду бензимидазолов. Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1991. 159 с.
7. Barcelona M. L., Favilla R., Von Berger J., Avitahile M., Ragusa N., Masotti L.//Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 250. № 1. P. 48—53.
8. Иванов С. Д., Квитко И. Я., Ртищев Н. И., Фомина Е. И., Нагорская Л. П.//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 648—655.
9. Иванов С. Д.//Тез. докл. VII конференции по спектроскопии биополимеров. Харьков, 1991. С. 119, 120.
10. Asseline U., Delarue M., Lancelot G.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 11. P. 3297—3301.
11. Молекулярные основы действия антибиотиков/Ред. Гаузе Г. Ф. М.: Мир, 1975. С. 500.
12. Lerman L. S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1963. V. 49. № 1. P. 94—102.
13. Веселков А. И., Морошкина Е. Б., Соболева С. И., Фрисман Э. В.//Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. № 2. С. 481—487.
14. Иванов С. Д., Гарабаджу А. В., Ртищев Н. И., Фомина Е. И., Колосова О. Ю.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1041—1047.
15. Georgiev G. P.//Annual Rev. Genetics. 1969. V. 3. № 3. P. 155—205.
16. Ртищев Н. И., Лебедева Г. К., Квитко И. Я., Ельцов А. В.//Журн. общ. химии. 1988. Т. 58. Вып. 9. С. 2148—2163.
17. Jin R., Breslauer K. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 23. P. 8939—8942.
18. Weisblum B., Haenssler E.//Chromosoma. 1974. V. 46. № 2. P. 255—260.
19. Comings D. E.//Chromosoma. 1975. V. 52. № 2. P. 229—243.
20. Pjura P. E., Grzeskowiuk K., Dickerson R. E.//J. Mol. Biol. 1987. V. 197. № 2. P. 257—271.
21. Young J. K., Graham W. H., Beard D. J., Hicks R. P.//Biopolymers. 1992. V. 32. № 8. P. 1061—1064.
22. Skocrylas B.//Acta biochim. pol. 1988. V. 35. № 1. P. 225—231.
23. Гаупман З., Грефе Ю., Ремане Х. Органическая химия: Пер. с нем. М.: Химия, 1979. С. 832.
24. Марч Дж. Органическая химия: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. Т. 1. С. 459.
25. Марч Дж. Органическая химия: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. Т. 2. С. 504.
26. Сайкс П. Механизмы реакций в органической химии: Пер. с англ. М.: Химия, 1991. С. 447.
27. Пальм В. А. Введение в теоретическую органическую химию. М.: Высш. школа, 1974. С. 446.
28. Пожарский А. Ф. Теоретические основы химии гетероциклов. М.: Химия, 1985. С. 280.
29. Preston I., De Winter W., Hofferbert W. I.//J. Heterocycl. Chem. 1969. V. 6. № 1. P. 119—121.
30. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 3. P. 265—275.
31. Scatchard G.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1949. V. 51. № 7. P. 660—672.

Поступила в редакцию  
24.XII.1992

После доработки  
10.I.1994

V. S. Sibirtsev, A. V. Garabadgiu<sup>\*</sup>, S. D. Ivanov

MECHANISMS OF INTERACTIONS OF SOME  
PHENYLBENZOIMIDAZOLE AND PHENYLINDOLE DYES  
WITH DNA

*Central Research Institute of Roentgenology and Radiology, Russian Academy of  
Medical Sciences, Sankt-Petersburg;*

*<sup>\*</sup> Sankt-Petersburg Technological Institute, Sankt-Petersburg*

Interactions of several phenylbenzoimidazole and phenylindole dyes with DNA were investigated by means of absorption and fluorescent spectra in aqueous solutions. Relative contributions of ionic and hydrogen bonds in to these interactions were determined. Spectral properties of the pure dyes in isopropanol were studied to evaluate the influence of microenvironmental factors on the emission of potentially active fluorochromes. Several parameters of the dyes' binding with nucleic acids was calculated basing on spectral data. Relations among some binding characteristics and spectral parameters of the dyes are presented. A series of terminal electronic donor—acceptor substituents for the directed synthesis of new fluorochromes for DNA are suggested and requirements for their application for several classes of compounds are formulated.