



УДК 577.113.7:547.785.5.057

ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ОПРЕДЕЛЕННЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК. XII. СИНТЕЗ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ ХЁХСТ 33258

© 2005 г. А. В. Громыко*, К. В. Попов*, А. П. Мозолева*, С. А. Стрельцов*,
С. Л. Гроховский**, В. А. Олейников***, А. Л. Жузе**

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

**Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва;

***Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Поступила в редакцию 07.10.2004 г. Принята к печати 27.11.2004 г.

Синтезированы бис-Хёхсты, сконструированные из двух молекул флуоресцентного красителя Хёхст 33258, связанных через их фенольные гидроксильные группы соответственно пента-, гептаметиленовыми или триэтиленгликолевым мостиками. Рисунок дифференциального окрашивания хромосом из клеток промиелоцитарной лейкемии человека HL60 проявлялся при использовании всех трех флуоресцентных красителей, однако наиболее контрастным, сопоставимым по качеству с рисунком, получаемым при окраске хромосом 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), он оказался при использовании бис-Хёхста с гептаметиленовым мостиком. Исследована способность трех бис-Хёхстов проникать в живые клетки фибробластов человека. Установлено, что яркости флуоресценции ядер живых и фиксированных клеток, окрашенных бис-Хёхстами с пента- и гептаметиленовыми мостиками, мало различались, а ядра живых клеток, окрашенных бис-Хёхстом с триэтиленгликолевым мостиком, светились значительно слабее фиксированных. Бис-Хёхсты – новые перспективные флуоресцентные красители, способные как к дифференциальной окраске хромосом, так и к проникновению через клеточную и ядерную мембраны с эффективным окрашиванием ядер клеток.

Ключевые слова: димерный Хёхст 33258, синтез; ДНК, узкобороздочный лиганд; хромосома, флуоресцентный краситель.

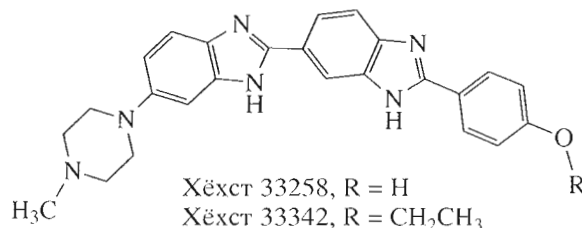
ВВЕДЕНИЕ

Важной фармакологической задачей является создание лекарственных препаратов, сайт-специфически связывающихся с ДНК, поскольку химиотерапевтическая активность большинства из существующих противоопухолевых препаратов зависит от силы и селективности их взаимодействия с ДНК.

В настоящее время в химиотерапии рака и в противовирусной терапии наблюдается тенденция замены традиционных лекарств, разрушающих ДНК неселективным способом, новыми агентами, нековалентно взаимодействующими с ДНК и влияющими на процессы ее репликации и транскрипции. Поэтому большой интерес представляет конструирование низкомолекулярных лигандов, которые могли бы нековалентно и сайт-спе-

цифично связываться с узкой бороздкой ДНК. Такие сайт-специфические соединения будут иметь важное значение для наведения их на определенные гены в геноме и для использования в химиотерапии. Подобные соединения могли бы служить как инструментами исследования, так и терапевтическими агентами, контролирующими экспрессию генов в клетках.

Ранее, с использованием молекулярной модели для комплексов АТ-специфичных антибиотиков нетропсина и дистамицина А с ДНК, предложенной Заседателевым и др. [2], нами были сконст-



Сообщение XI см. [1].

Автор для переписки (тел.: (095) 135-97-18; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: zhuze@imb.ac.ru).

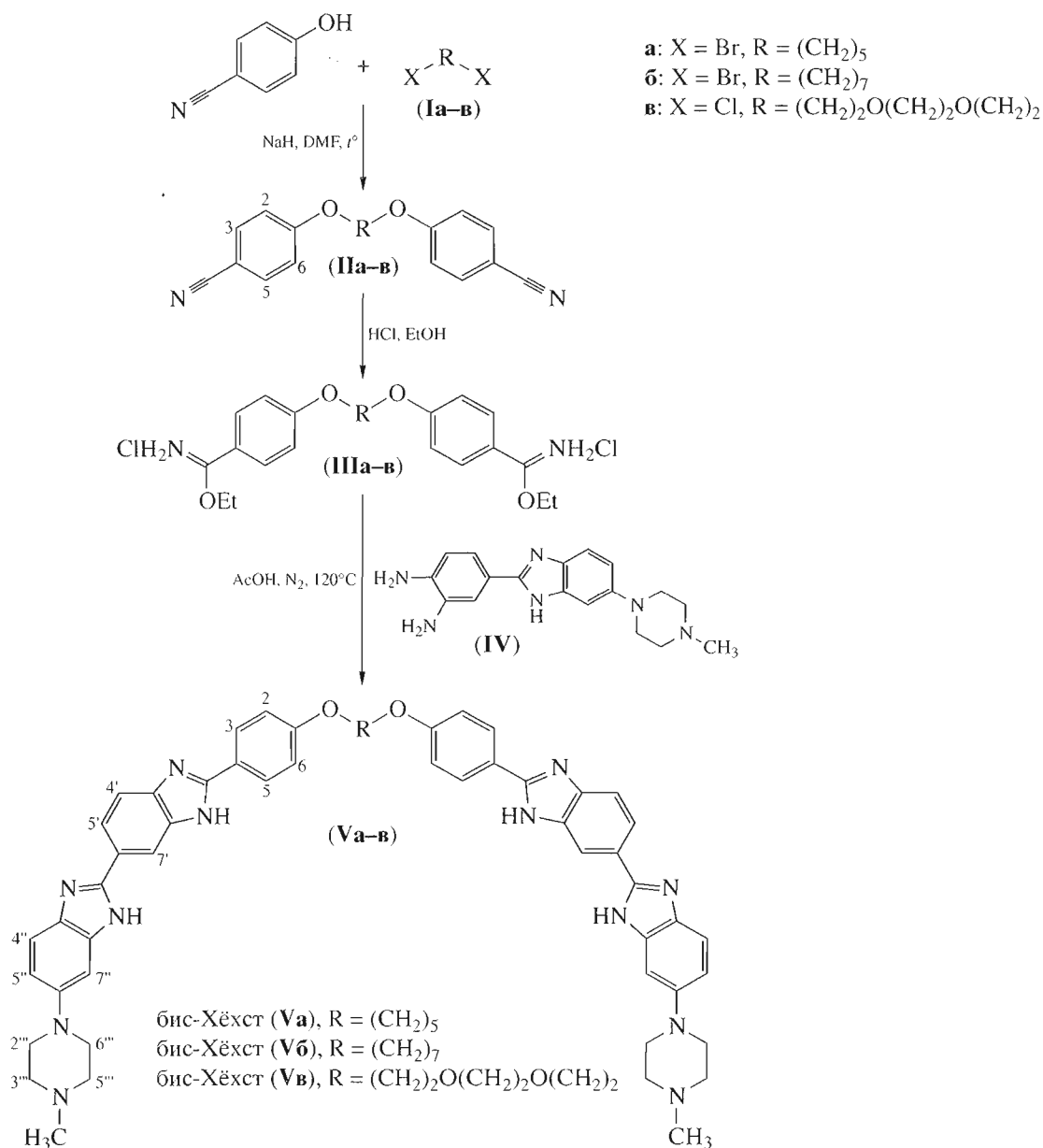


Схема 1. Схема синтеза бис-Хёхстов (Va)–(Vв).

руированы и синтезированы димерные лиганды – бис-нетропсины [3–6], построенные на основе пирролкарбоксамидного структурного мотива и оказавшиеся первым классом лигандов, нековалентно и сайт-специфично связывающихся с ДНК. Общий принцип создания такого рода соединений заключался в соединении различными звеньями одного или нескольких пирролкарбоксамидных блоков. Такая структура позволяет определенным образом ориентировать и фиксировать эти А·Т-узнающие пирролкарбоксамидные блоки в комплексе с ДНК [5, 6]. Изучение физико-химических [4, 6] и биохимических [1, 6–10] свойств комплексов этих димерных лигандов с

ДНК показало, что нетропсиновые фрагменты специфично связываются с двумя кластерами из А·Т-пар оснований. Впоследствии этот подход был успешно использован для создания иных димерных сайт-специфичных соединений на основе различных комбинаций пирролкарбоксамидных и имидазолкарбоксамидных блоков [11–15].

В настоящей работе для создания нового класса димерных сайт-специфичных лигандов в качестве исходного соединения был выбран краситель Хёхст 33258, широко используемый в цитологии в качестве ДНК-специфичной флуоресцентной метки [16]. Известно, что Хёхст 33258 ингибирует взаимодействие ТАТА-боксовывающего белка с

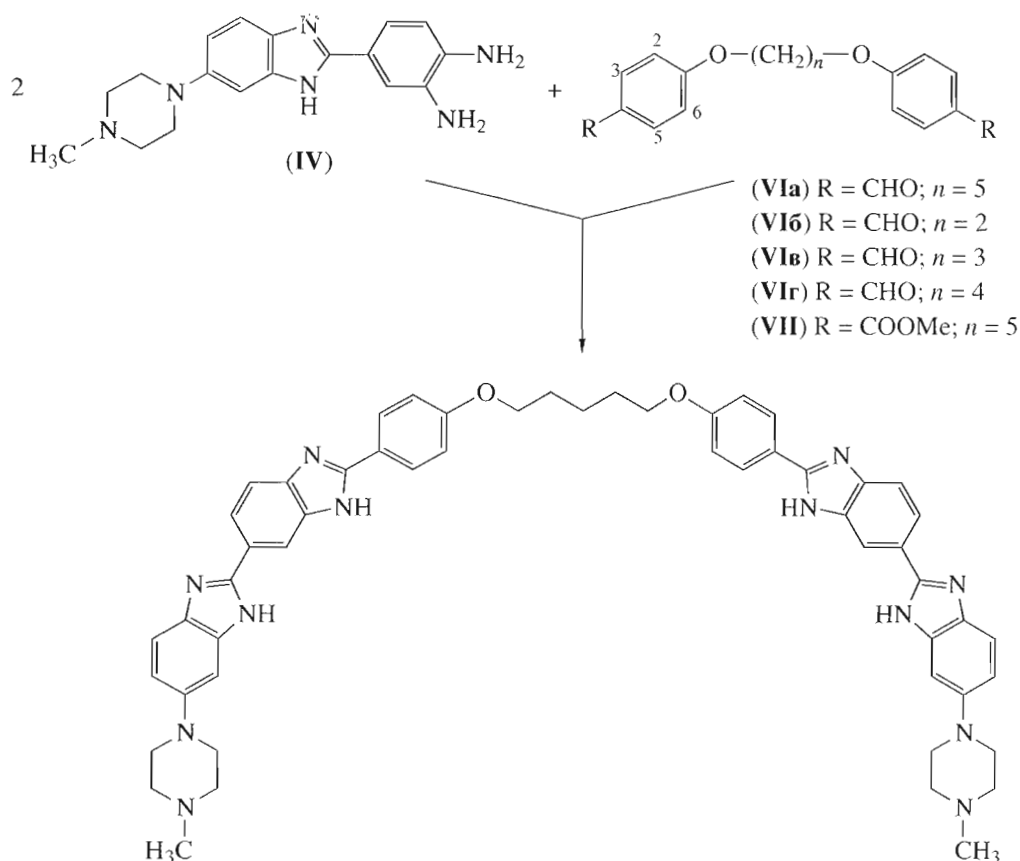


Схема 2. Альтернативная схема синтеза бис-Хёхста (Va).

ДНК [17], является эффективным ингибитором ДНК-топоизомеразы I [18] и ДНК-хеликаз [19], а кроме того обладает радиопротекторным свойством [20].

Хёхст 33258 связывается нековалентно с В-формой ДНК по узкой бороздке, предпочтительно взаимодействуя с кластерами из трех/четырех А·Т-пар (со стехиометрией одна молекула лиганда на один сайт связывания) и накрывая при этом полвитка двойной спирали ДНК [21–24]. Было установлено, что из всех А·Т-триплетов Хёхст 33258 обладает максимальным сродством к последовательности (5′)-AA(A/T), а в случае А·Т-тетраплетов – к последовательности (5′)-AATT [25].

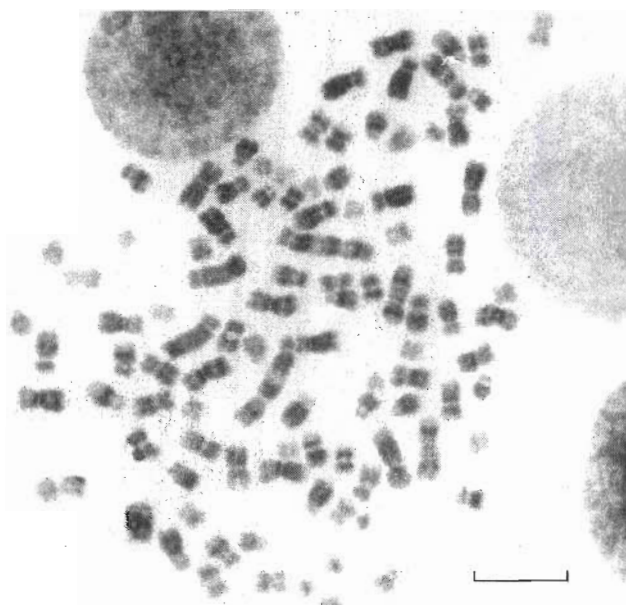
А·Т-специфичность Хёхст 33258 определяется остовом молекулы красителя, состоящим из двух бензимидазольных фрагментов, связанных друг с другом по типу “голова-к-хвосту”. При взаимодействии с ДНК каждый бензимидазольный фрагмент образует бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с О2-атомом тимина и/или N3-атомом аденина двух соседних А·Т-пар, накрывая при этом участок приблизительно в полторы пары оснований [23, 26]. Связывание Хёхст 33258

стабилизируется также за счет электростатических и интенсивных ван-дер-ваальсовых взаимодействий со стенками узкой бороздки ДНК.

Для создания более специфичных лигандов, узнающих два сайта, состоящих из трех или четырех А·Т-пар – (A/T)_n-NN-(A/T)_n (где n = 3 или 4) и накрывающих при этом один виток двойной спирали ДНК, был осуществлен синтез трех димерных бисбензимидазолов – бис-Хёхстов (Va)–(Vb), состоящих из двух молекул Хёхст 33258, связанных через их фенольные гидроксильные группы пента-, гептаметиленовым или триэтиленгликолевым мостиками соответственно. Выбор этих мостиков основывался на модельных построениях, а также на анализе результатов исследования комплексов известных бисбензимидазольных лигандов с олигонуклеотидами [27, 28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор Хёхст 33258 в качестве базовой молекулы для конструирования новых сайт-специфичных лигандов был обусловлен как его АТ-специфичностью, так и способностью его аналога, Хёхст 33342, проникать через клеточные мембра-



Негативное изображение метафазных хромосом клеток HL60, окрашенных бис-Хёхстом (Vб). Масштабная линейка – 10 мкм.

ны, сохраняя при этом свои флуоресцентные свойства. Мы полагали, что сохранение способности к флуоресценции позволит надежно детектировать даже незначительные количества новых лигандов, что будет выгодно отличать планируемые бис-Хёхсты (Va)–(Vв) от синтезированных нами ранее бис-нетропсина, поскольку позволит следить за локализацией молекул бис-Хёхстов в клетке.

Для создания димерных бисбензимидазолов на примере бис-Хёхста (Va) были апробированы три метода синтеза. Наилучшим оказался метод конденсации 2-амино-4-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-бензимидазол-2-ил]фениламина (IV) [29] с этиловым эфиром 4-[(5-{4-[этоксид(имино)метил]феноксипентил}окси)-1-фенилимидовой кислоты (IIIa) (кипячение 20 мин в ледяной уксусной кислоте в атмосфере азота), соединение (Va) было получено с выходом 29.4% (схема 1). Диимидат (IIIa) был синтезирован по реакции Пиннера, исходя из 4-[(5-(4-цианофеноксипентил)окси)бензонитрила (IIa), который в свою очередь был получен при алкилировании алкоголята 4-гидроксibenзонитрила 1,5-дибромпентаном в DMF.

Для осуществления второго пути мы синтезировали ряд диальдегидов (VIa)–(VIg) алкилированием алкоголята 4-гидроксibenзальдегида α,ω -дибромалканами с целью их дальнейшей конденсации с диамином (IV) для получения соответствующих бисбензимидазолов. Однако выяснилось, что продолжительное нагревание в этаноле в инертной атмосфере диамина (IV) с 4-[5-(4-формилфеноксипентилокси)бензальдегидом (VIa) в

присутствии *n*-бензохинона с целью получения соединения (Va) не приводит к желаемым результатам из-за существенного осмоления компонентов реакционной смеси (схема 2), поэтому соединения (VIб)–(VIg) не использовали в дальнейшем для получения соответствующих бис-Хёхстов.

При апробации третьего пути – конденсации диамина (IV) с метиловым эфиром 4-{5-[4-(метоксикарбонил)феноксипентилокси]бензойной кислоты (VII) в присутствии P₂O₅ в метансульфокислоте [30] – в первые 15 мин начиналось образование соединения (Va), но в ходе дальнейшей реакции происходил распад его молекул с образованием мезильного производного Хёхст 33258 (по данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии). Этот путь далее также не разрабатывался.

Основываясь на полученных результатах, мы синтезировали соединения (Vб) и (Vв) конденсацией диамина (IV) с диимидатами (IIIб) и (IIIв) с выходами 24.8 и 23.3% соответственно (схема 1).

Изменение спектра поглощения соединения (Va) в присутствии ДНК из тимуса телят свидетельствовало об образовании ими комплекса [31]. Идентификация хромосом в большинстве цитогенетических исследований проводится по рисунку дифференциальной окраски. Для получения этого рисунка, специфичного для пар гомологичных хромосом, разработано большое количество методик [32]. При использовании методик, основанных на гибридизации последовательностей ДНК *in situ* с их последующим флуоресцентным выявлением (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), обычно используют различные виды так называемого Q-окрашивания, основанного на выявлении АТ-специфичными флуорохромами неравномерного распределения АТ/ГС-пар вдоль хромосом. Наиболее часто используемым для этого красителем является DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол), поскольку по своим спектральным характеристикам он удобен при сочетаемом применении с красителем, используемым для мечения ДНК-проб [33]. Помимо DAPI для получения рисунка дифференциального окрашивания хромосом в ряде случаев используется Хёхст 33258 [34]. При обработке хромосом каждым из полученных нами флуоресцентных красителей (Va)–(Vв) был обнаружен рисунок дифференциального окрашивания, однако наиболее контрастным оказался рисунок при окраске хромосом бис-Хёхстом (Vб) (рисунок), сопоставимый по качеству с рисунком, получаемым при окраске DAPI.

Известно, что краситель Хёхст 33342 способен проникать через неповрежденные мембраны клеток [35]. Изучение способности бис-Хёхстов (Va)–(Vв) проникать в живые клетки фибробластов человека показало, что яркости флуоресценции ядер живых и фиксированных клеток, окрашенных бис-Хёхстами (Va) и (Vб), мало отличались

друг от друга. Ядра живых клеток, окрашенных бис-Хёхстом (**Vb**), светились значительно слабее фиксированных. Однако временная динамика проникновения красителей в клетки нами не была исследована.

Таким образом, синтезированные соединения – бис-Хёхсты (**Va**)–(**Vb**) – являются новыми перспективными флуоресцентными красителями, способными проникать через клеточную и ядерную мембраны и эффективно окрашивать ядра клеток.

В дальнейшем мы планируем изучить сайт-специфичность бис-Хёхстов методом футпринтинга с помощью ДНКазы I и исследовать способность этих соединений ингибировать каталитическую активность ДНК-топоизомеразы I человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 4-гидроксибензальдегид, 1,5-дибромпентан, 1,7-дибромгептан, гидрид натрия (80% суспензия в вазелиновом масле) (Fluka, Швейцария); 4-гидроксибензонитрил (Aldrich, США) и 1,2-бис(2-хлороэтокси)этан (Merck, Германия). Растворы веществ в органических растворителях сушили над Na_2SO_4 . Растворители упаривали на роторном испарителе, как правило, при 50°C в вакууме водоструйного насоса. Вещества высушивали в вакууме над P_2O_5 и NaOH . Температуры плавления определяли на приборе Voethius (Германия) и не исправляли. Гидрирование проводили над катализатором Адамса [36] при атмосферном давлении и комнатной температуре до прекращения поглощения водорода. Чистоту полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F_{254} (Merck, Германия) в следующих системах: $\text{MeOH}-\text{Et}_3\text{N}$, 50 : 1 (А); $\text{CHCl}_3-\text{Pr}^i\text{OH}$, 100 : 1 (Б). Вещества на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете по поглощению при 254 нм или по возбуждению флуоресценции при 365 нм. Спектры поглощения бис-Хёхстов (**Va**)–(**Vb**) регистрировали в 1 мМ какодилатном буфере (рН 6.8) в присутствии 10% DMSO (по объему). Спектр ^1H -ЯМР регистрировали на приборе AMX-400 (Bruker, Германия, 400.0 МГц) в $\text{DMSO}-d_6$ (δ , м.д.; J , Гц) при 23°C (если специально не оговорено); в качестве внутреннего стандарта использовали сигнал остаточных протонов растворителя. Нумерация атомов водорода бензимидазольных циклов и пиперазина приведены на схеме 1. Отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР соединений (**Va**)–(**Vb**) было сделано с использованием данных работы [37]. Масс-спектры бис-Хёхстов (**Va**)–(**Vb**) получены на времяпролетном приборе Vision-2000 (ThermoBioanalysis, Великобритания) в режиме регистрации положительных ионов; матрица – 2,5-дигидроксибензойная кислота; N_2 -лазер, 337 нм. Масс-спектры динитрилов (**IIa**)–(**IIb**), диальдегидов (**VIa**)–(**VIr**) и соединения

(**VII**) получены методом электронной ионизации на приборах Polaris CQ 230 (Finnigan, США) и MS-890 (Kratos, Великобритания) при прямом вводе и температуре $160\text{--}200^\circ\text{C}$; энергия электронов 70 эВ; температура ионизационной камеры 250°C .

Общий метод синтеза динитрилов (IIa)–(IIb). К 2.4 ммоль NaN в 3.0 мл DMF добавляли при 0°C 2.4 ммоль 4-гидроксибензонитрила и реакционную смесь при перемешивании нагревали при 80°C до полного растворения NaN . Затем к раствору добавляли 1.0 ммоль α,ω -дигалогеналкана (**Ia**)–(**Ib**) и нагревали 1 ч при 80°C (для соединений (**Ia**) и (**Ib**)) или 1 ч при $110\text{--}120^\circ\text{C}$ в присутствии 0.1 ммоль NaI в случае 1,2-бис(2-хлороэтокси)этана (**Ib**). По охлаждению к реакционной смеси добавляли 10 мл H_2O , выпавший осадок отделяли, промывали H_2O , высушивали и полученный динитрил (**II**) дважды перекристаллизовывали из этанола.

4-[[5-(4-Цианофенокси)пентил]окси]бензонитрил (IIa). Выход 95.7%, R_f 0.34 (Б), т. пл. $109\text{--}110^\circ\text{C}$. ^1H -ЯМР: 1.56 (2 H, м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.79 (4 H, м, OCH_2CH_2); 4.07 (4 H, т, J 6.23, OCH_2); 7.09 (4 H, д, J 9.03, H2,H6); 7.75 (4 H, д, J 9.03, H3,H5). Масс-спектр (Polaris CQ 230), m/z : 307.1 $[M + \text{H}]^+$, рассчитана M 306.3 ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$).

4-[[7-(4-Цианофенокси)гептил]окси]бензонитрил (IIb). Выход 85.7%, R_f 0.38 (Б), т. пл. 112°C . ^1H -ЯМР: 1.39 (6 H, м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3$); 1.72 (4 H, м, OCH_2CH_2); 4.04 (4 H, т, J 6.54, OCH_2); 7.08 (4 H, д, J 8.72, H2,H6); 7.74 (4 H, д, J 8.72, H3,H5). Масс-спектр (Polaris CQ 230), m/z : 333.9 $[M]^+$, рассчитана M 334.4 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$).

4-(2-{2-[2-(4-Цианофенокси)этокси]этокси}этокси)бензонитрил (IIв). Выход 71.0%, R_f 0.06 (Б), т. пл. $77\text{--}80^\circ\text{C}$. ^1H -ЯМР: 3.60 (4 H, с, $\text{EtOCH}_2\text{CH}_2\text{OEt}$); 3.75 (4 H, т, J 4.05, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$); 4.17 (4 H, т, J 4.05, PhOCH_2); 7.10 (4 H, д, J 8.40, H2,H6); 7.75 (4 H, д, J 8.40, H3,H5). Масс-спектр (Polaris CQ 230), m/z : 352.9 $[M + \text{H}]^+$, рассчитана M 352.4 ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$).

Общий метод синтеза дихлоргидратов динимидоэфиров (IIIa)–(IIIв). Суспензию 1 ммоль динитрилов (**IIa**)–(**IIb**) в 5 мл абс. этанола при перемешивании насыщали сухим хлористым водородом при 0°C в течение 15 мин до полного растворения исходных соединений, после чего реакционную смесь оставляли при комнатной температуре на 4 дня в плотно закрытой посуде. Растворитель упаривали в вакууме досуха, твердый остаток сушили в вакууме над NaOH и P_2O_5 . Полученные дихлоргидраты динимидоэфиров (**IIIa**)–(**IIIв**) использовали в дальнейшем синтезе без очистки.

Бис-Хёхст (Va). Раствор 0.313 г (0.665 ммоль) дихлоргидрата этилового эфира 4-[(5-[4-[этокси(имино)метил]фенокси]пентил]окси]-1-фенилимидовой кислоты (**IIIa**) и 0.429 г (1.330 ммоль) 2-амино-4-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-бензимидазол-2-ил]фениламина (**IV**) [29] в 5 мл AcOH кипятили 20 мин в атмосфере азота. После

охлаждения до комнатной температуры выпавшие ярко-желтые кристаллы отделяли, промывали АсОН и бензолом, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток растворяли в 3 мл АсОН. Густую суспензию, образовавшуюся после добавления трех капель конц. НСl, кипятили до полного растворения всех кристаллов. Выпавшие после охлаждения ярко-желтые кристаллы отделяли и промывали АсОН и бензолом. Обе порции кристаллов объединяли и перекристаллизовывали из смеси 15 мл МеОН и 1 мл Et₃N. Выпавшее вещество промывали на фильтре МеОН и его раствор в 12 мл смеси МеОН–АсОН (10 : 2) кипятили с активированным углем. После удаления угля раствор упаривали в вакууме и остаток перекристаллизовывали из 11 мл смеси МеОН–Et₃N (10 : 1). Выпавшее вещество промывали на фильтре МеОН, затем растворяли в 3 мл АсОН и добавляли две капли конц. НСl. Раствор упаривали в вакууме, остаток суспендировали в 4 мл кипящего МеОН и добавляли пять капель конц. НСl в 3 мл метанола. Полученную суспензию оставляли на ночь в холодильнике, выпавший желтый кристаллический продукт отделяли и дважды промывали МеОН. После высушивания в вакууме над NaOH и P₂O₅ выход гексахлоргидрата соединения (Va) составил 0.222 г (29.4%), т. пл. >260°C, R_f 0.14 (A), λ_{max} 341 нм (ε₃₄₁ 70000 М⁻¹ см⁻¹). Бис-Хёхст (Va) в растворе обладал желто-зеленой флуоресценцией. Для уточнения отнесения сигналов в области 3.0–4.0 и 7.0–8.5 м. д. спектр ¹H-ЯМР бис-Хёхста (Va) регистрировали при температуре 380 К: 1.69 (2 H, м, ОСН₂СН₂СН₂); 1.91 (4 H, м, ОСН₂СН₂); 2.85 (6 H, с, NСН₃); 3.37 (8 H, м, НЗ''',Н5'''); 3.57 (8 H, м, Н2''',Н6'''); 4.19 (4 H, т, J 6.30, ОСН₂); 7.14 (4H, д, J 8.72, Н2,Н6); 7.15 (2 H, дд, J 9.03, 1.87, Н5''); 7.23 (2 H, д, J 1.87, Н7''); 7.62 (2 H, д, J 9.03, Н4''), 7.76 (2 H, д, J 8.41, Н4''); 8.12 (2 H, дд, J 8.41, 1.56, Н5''); 8.22 (4 H, д, J 8.72, Н3,Н5); 8.51 (2 H, д, J 1.56, Н7'). Масс-спектр (Vision-2000), m/z: 918.6 [M + H]⁺, рассчитана M 917.1 (C₅₅H₅₆N₁₂O₂).

Бис-Хёхст (Vб). Раствор 0.323 г (0.65 ммоль) дихлоргидрата этилового эфира 4-[(7-{4-[этоксидимино)метил]феноксид}гептил)окси]-1-фенилиминовой кислоты (IIIб) и 0.425 г (1.32 ммоль) 2-амино-4-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-бензимидазол-2-ил]фениламина (IV) в 4 мл АсОН кипятили с обратным холодильником 30 мин в атмосфере азота. Выпавшую после охлаждения до комнатной температуры желеобразную массу отделяли, промывали бензолом, растворяли в 10 мл МеОН и пересаждали 20 мл смеси Pr'ОН–конц. NH₄ОН (1 : 1). Выпавшее вещество перекристаллизовывали из 5 мл МеОН, а остаток из фильтрата после упаривания в вакууме – из 10 мл МеОН. Остаток после упаривания объединенных маточных растворов несколько раз перекристаллизовывали из смеси МеОН–Pr'ОН (2 : 3). Все выпавшие кристаллы

объединяли и растворяли в смеси МеОН–АсОН, затем растворители упаривали в вакууме, а остаток перекристаллизовывали из 11 мл смеси МеОН–Et₃N (10 : 1). Полученный осадок растворяли в 12 мл смеси МеОН–АсОН (5 : 1) и трижды обрабатывали активированным углем, пока раствор не приобрел светло-желтый цвет. После удаления растворителя в вакууме остаток перекристаллизовывали из 5.5 мл смеси МеОН–Et₃N (10 : 1) и оставляли на ночь в холодильнике. Выпавший продукт отделяли, промывали метанолом и растворяли в смеси 12 мл МеОН–АсОН (5 : 1). Органические растворители удаляли в вакууме, а остаток перекристаллизовывали из 9 мл смеси МеОН–Et₃N (8 : 1). К раствору, полученному после обработки выпавшего продукта смесью 11 мл МеОН–АсОН (10 : 1), добавляли 0.5 мл конц. НСl и выпавшую суспензию оставляли на ночь в холодильнике. Полученное вещество желтого цвета отделяли и дважды промывали на фильтре 5 мл метанола. После высушивания в вакууме над NaOH и P₂O₅ выход гексахлоргидрата соединения (Vб) составил 0.188 г (24.85%), т. пл. >260°C, R_f 0.16 (A), λ_{max} 342 нм (ε₃₄₂ 82700 М⁻¹ см⁻¹). Бис-Хёхст (Vб) в растворе обладал желто-зеленой флуоресценцией. ¹H-ЯМР: 1.46 (6 H, м, ОСН₂СН₂(СН₂)₃); 1.78 (4 H, м, ОСН₂СН₂); 2.85 (6 H, с, NСН₃); 3.21 (8 H, м, НЗ''',Н5'''); 3.54 (4 H, м, Н2''',Н6'''); 3.89 (4 H, м, Н2''',Н6'''); 4.10 (4 H, т, J 6.23, ОСН₂); 7.16 (4 H, д, J 8.72, Н2,Н6); 7.17 (2 H, с, Н7''); 7.30 (2 H, дд, J 9.03, J 1.25, Н5''); 7.68 (2 H, д, J 9.03, Н4''); 7.87 (2 H, д, J 8.72, Н4''); 8.19 (2 H, дд, J 8.72, 1.25, Н5''); 8.25 (4 H, д, J 8.72, Н3,Н5); 8.59 (2 H, с, Н7''); 10.95 (4 H, с, NH). Масс-спектр (Vision-2000), m/z: 946.4 [M + H]⁺, рассчитана M 945.1 (C₅₇H₆₀N₁₂O₂).

Бис-Хёхст (Vв). Раствор 0.603 г (1.87 ммоль) диамина (IV) и 0.485 г (0.935 ммоль) дихлоргидрата диимидозифира (IIIв) в 5 мл АсОН кипятили с обратным холодильником 30 мин в атмосфере азота. После упаривания растворителя в вакууме остаток растворяли в горячей H₂O и высаживали вещество конц. NH₄ОН. Раствор декантировали с маслообразного продукта и промывали его водой. Раствор выпавшего продукта в МеОН кипятили с активированным углем, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 3 мл EtОН и пересаждали добавлением 3 мл H₂O и 0.4 мл конц. NH₄ОН. Повторно пересаждали полученное вещество из 3 мл EtОН добавлением 1 мл H₂O. Затем продукт трижды пересаждали из 3 мл EtОН добавлением 7 мл ацетона. Полученное вещество кипятили с 3 мл EtОН и отделенный после охлаждения осадок перекристаллизовывали сначала из 6 мл МеОН, а затем целевой продукт суспендировали при нагревании в смеси 0.6 мл DMF с 3 мл Pr'ОН. При добавлении 2 мл H₂O вся суспензия растворилась и при дальнейшем добавлении 4 мл H₂O началась кристаллизация. Осадок отделяли, промы-

вали $\text{P}^{\text{r}}\text{OH}$ и водой. После высушивания в вакууме выход соединения (**Vb**) составил 0.229 г (25.4%). Основание (**Vb**) было переведено в протонированную форму растворением в смеси MeOH с AcOH , упариванием растворителей, растворением остатка в 4 мл MeOH и обработкой раствора смесью 3 мл MeOH и 1 мл конц. HCl . Гексахлоргидрат соединения (**Vb**) желтого цвета осаждали 12 мл ацетона, отделяли, промывали ацетоном и высушивали в вакууме. Выход соединения (**Vb**) составил 0.258 г (23.34%), т. пл. $>260^{\circ}\text{C}$, R_f 0.12 (A), λ_{max} 340 нм ($\epsilon_{340} = 70800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Бис-Хёхст (**Vb**) в растворе обладал желто-зеленой флуоресценцией. Для уточнения отнесения сигналов в области 3.0–4.0 и 7.0–8.5 м.д. спектр ^1H -ЯМР бис-Хёхста (**Vb**) регистрировали при температуре 380 К: 2.85 (6 Н, с, NCH_3); 3.37 (8 Н, м, H^3 , H^5); 3.59 (8 Н, м, H^2 , H^6); 3.71 (4 Н, с, $\text{EtOCH}_2\text{CH}_2\text{OEt}$); 3.85 (4 Н, т, J 4.83, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.26 (4 Н, т, J 4.83, PhOCH_2); 7.14 (4 Н, д, J 8.72, H^2, H^6); 7.18 (2 Н, дд, J 9.03, 1.87, H^5); 7.24 (2 Н, д, J 1.87, H^7); 7.64 (2 Н, д, J 9.03, H^4); 7.77 (2 Н, д, J 8.72, H^4); 8.13 (2 Н, дд, J 8.72, 1.25, H^5); 8.22 (4 Н, д, J 8.72, H^3, H^5); 8.54 (2 Н, с, H^7). Масс-спектр (Vision-2000), m/z : 963.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитана M 963.0 ($\text{C}_{56}\text{H}_{58}\text{N}_{12}\text{O}_4$).

Общий метод синтеза диальдегидов (VIa)–(VIg). Получение диальдегидов было осуществлено по методике синтеза динитрилов (**II**) с использованием соответствующих α, ω -дибромалканов (1,5-дибромпентана для (**VIa**); 1,2-диброметана для (**VIб**); 1,3-дибромпропана для (**VIв**) и 1,4-дибромбутана для (**VIг**)) и 4-гидроксибензальдегида вместо 4-гидроксибензонитрила. Реакцию алкилирования проводили 1 ч при 80°C . Целевые продукты после окончания реакции высаживали водой, отделяли, промывали водой и после высушивания использовали в дальнейшем без дополнительной очистки. Аналитические образцы диальдегидов были получены после перекристаллизации из смеси бензол–гексан.

4-[5-(4-Формилфенокси)пентилокси]бензальдегид (VIa). Выход 94.6%, т. пл. 80 – 82°C , R_f 0.15 (A). ^1H -ЯМР: 1.58 (2 Н, м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.82 (4 Н, м, OCH_2CH_2); 4.11 (4 Н, т, J 6.54, OCH_2); 7.12 (4 Н, д, J 8.72, H^2, H^6); 7.85 (4 Н, д, J 8.72, H^3, H^5); 9.86 (2 Н, с, CHO). Масс-спектр (MS-890), m/z : 312.0 $[\text{M}]^+$, рассчитана M 312.36 ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$).

4-[2-(4-Формилфенокси)этокси]бензальдегид (VIб). Выход 23.0%, т. пл. 118 – 120°C , R_f 0.14 (A). ^1H -ЯМР: 4.49 (4 Н, с, CH_2CH_2); 7.19 (4 Н, д, J 8.50, H^2, H^6); 7.88 (4 Н, д, J 8.50, H^3, H^5); 9.88 (2 Н, с, CHO). Масс-спектр (MS-890), m/z : 270.0 $[\text{M}]^+$, рассчитана M 270.28 ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$).

4-[3-(4-Формилфенокси)пропокси]бензальдегид (VIв). Выход 88.1%, т. пл. 125 – 126.5°C , R_f 0.16 (A). ^1H -ЯМР: 2.25 (2 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.27 (4 Н, т, J 6.23, OCH_2); 7.15 (4 Н, д, J 8.50, H^2, H^6); 7.86 (4 Н,

д, J 8.50, H^3, H^5); 9.84 (2 Н, с, CHO). Масс-спектр (MS-890), m/z : 284.0 $[\text{M}]^+$, рассчитана M 284.30 ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$).

4-[4-(4-Формилфенокси)бутокси]бензальдегид (VIг). Выход 90.18%, т. пл. 100 – 102°C , R_f 0.14 (A). ^1H -ЯМР: 1.91 (4 Н, м, OCH_2CH_2); 4.17 (4 Н, м, OCH_2); 7.13 (4 Н, д, J 8.72, H^2, H^6); 7.86 (4 Н, д, J 8.72, H^3, H^5); 9.86 (2 Н, с, CHO). Масс-спектр (MS-890), m/z : 298.0 $[\text{M}]^+$, рассчитана M 298.33 ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$).

Метилловый эфир 4-[5-[4-(метоксикарбонил)фенокси]пентилокси]бензойной кислоты (VII). Синтез диметилового эфира (**VII**) был осуществлен по методике синтеза динитрилов (**IIa**)–(**IIв**) с использованием 1,5-дибромпентана и метилового эфира 4-гидроксибензойной кислоты вместо 4-гидроксибензонитрила. Реакцию алкилирования проводили 2 ч при 80°C . Целевой продукт после окончания реакции высаживали водой, отделяли, промывали водой и после высушивания использовали в дальнейшем без дополнительной очистки. Выход диметилового эфира (**VII**) составил 81.80%, т. пл. 91 – 93°C , R_f 0.26 (A). ^1H -ЯМР: 1.57 (2 Н, м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.80 (4 Н, м, OCH_2CH_2); 3.80 (6 Н, с, CH_3); 4.07 (4 Н, т, J 6.54, OCH_2); 7.02 (4 Н, д, J 8.72, H^2, H^6); 7.89 (4 Н, д, J 8.72, H^3, H^5). Масс-спектр (Polaris CQ 230), m/z : 372.0 $[\text{M}]^+$, рассчитана M 372.41 ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$).

Исследование способности красителей дифференциально окрашивать хромосомы. Хромосомные препараты были приготовлены из клеток промиелоцитарной лейкемии человека HL60 (ATCC, США). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (Пан-Эко, Россия), содержащей 40 мкг/мл гентамицина (Акрихин, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Nucclone, США), при 37°C , 5% CO_2 и 95% влажности воздуха. Препараты готовили по стандартной методике [38] без накопления клеток в стадии митозов с помощью колхицина. Клетки в стадии логарифмического роста подвергали гипотонии в растворе 75 мМ KCl при 37°C в течение 30 мин. Фиксировали в смеси метиловый спирт–уксусная кислота (3 : 1). Полученную суспензию раскапывали на мокрые стекла. Стекла высушивали и хранили при комнатной температуре. Препараты окрашивали 1 мкМ растворами красителей в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 М NaCl , в течение 30 мин и наблюдали в этом же растворе. Изображение регистрировали ПЗС-камерой CoolSnap (Roper Scientific, США), установленной на флуоресцентном микроскопе Leitz с использованием объектива PlanApo64x NA1.4 и комбинации фильтров для DAPI (Ex 358/Em 461). Изображение редактировали в программе ImageJ 1.3 (National Institute of Health, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Оценка способности красителей проникать в живые клетки. Для проверки способности красителей проникать в живые клетки использовали нор-

мальные фибробласты человека. Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 40 мкг/мл гентамицина (Акрихин, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности воздуха. Клетки высаживали на покровные стекла, находящиеся в отдельных чашках Петри. Для каждого красителя использовали два стекла. Тест выполняли через двое суток после пересадки. Одно стекло из каждой пары чашек фиксировали в 70% этаноле, окрашивали 1 мкМ раствором красителя в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 30 мин. Трижды отмывали в PBS и заключали в PBS. Во вторую чашку в культуральную среду добавляли красители до концентрации 1 мкМ. Через 2 ч клетки отмывали от красителя в PBS и в нем же заключали препарат, после чего немедленно проводили микроскопическое изучение препаратов на том же микроскопе и с той же комбинацией фильтров, что и в случае изучения дифференциальной окраски хромосом. Яркости флуоресценции ядер фиксированных и живых клеток сравнивали визуально.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 04-03-33144, 04-04-49364 и 03-04-48602) и “Программы по молекулярной и клеточной биологии Президиума РАН”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гроховский С.Л., Николаев В.А., Готтих Б.П., Жузе А.Л. // Биоорг. химия. 2002. Т. 28. С. 502–517.
2. Заседателев А.С., Жузе А.Л., Циммер К., Гроховский С.Л., Туманян В.Г., Гурский Г.В., Готтих Б.П. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. С. 1006–1009.
3. Крылов А.С., Хорлин А.А., Гроховский С.Л., Жузе А.Л., Заседателев А.С., Гурский Г.В., Готтих Б.П. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 254. С. 234–238.
4. Khorlin A.A., Krylov A.S., Grokhovsky S.L., Zhuze A.L., Zasedatelev A.S., Gursky G.V., Gottikh B.P. // FEBS Lett. 1980. V. 118. P. 311–314.
5. Хорлин А.А., Гроховский С.Л., Жузе А.Л., Готтих Б.П. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. С. 1063–1069.
6. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Surovaya A.N., Nikitin S.M., et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
7. Речинский В.О., Бибилашвили Р.Ш., Хорлин А.А., Гроховский С.Л., Крылов А.С., Заседателев А.С., Жузе А.Л., Гурский Г.В., Готтих Б.П. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. С. 244–247.
8. Скамров А.В., Рыбалкин И.Н., Бибилашвили Р.Ш., Готтих Б.П., Гроховский С.Л., Гурский Г.В., Жузе А.Л., Заседателев А.С., Нечипуренко Ю.Д., Хорлин А.А. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 177–195.
9. Станчев Б.С., Гроховский С.Л., Хорлин А.А., Готтих Б.П., Жузе А.Л., Скамров А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С. 1614–1624.
10. Sukhanova A., Grokhovsky S., Zhuze A., Roper D., Bronstein I. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 44. P. 997–1010.
11. Schultz P.G., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 7748–7750.
12. Dervan P.B. // Science. 1986. V. 232. P. 464–471.
13. Lown J.W., Krowicki K., Balzarini J., Newman R.A., De Clercq E. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. P. 2368–2375.
14. Wyatt M.D., Garbiras B.J., Lee M., Forrow S.M., Hartley J.A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994. V. 4. P. 801–806.
15. White S., Szewczyk J.W., Turner J.M., Baird E.E., Dervan P.B. // Nature. 1998. V. 391. P. 468–471.
16. Latt S.A. // Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1976. V. 5. P. 1–37.
17. Chiang S.-Y., Welch J., Rauscher F.J. III, Beerman T.A. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 7033–7040.
18. Chen A.Y., Chiang Y., Gatto B., Liu L.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 8131–8135.
19. Soderlind K.-J., Gorodetsky B., Singh A.K., Bachur N.R., Miller G.G., Lown J.W. // Anti-Cancer Drug Design. 1999. V. 14. P. 19–36.
20. Lybimova N.V., Coullas P.G., Yuen K., Martin R.F. // Brit. J. Radiol. 2001. V. 74. P. 77–82.
21. Заседателев А.С., Михайлов М.В., Крылов А.С., Гурский Г.В. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. С. 756–760.
22. Harshman K.D., Dervan P.B. // Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. P. 4825–4835.
23. Teng M.-K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H.-J. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 2671–2690.
24. Parkinson J.A., Barber J., Douglas K.T., Rosamond J., Sharples D. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 10181–10190.
25. Drobyshv A.L., Zasedatelev A.S., Yershov G.M., Mirzabekov A.D. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 4100–4105.
26. Vega M.C., Saez I.G., Aymami J., Eritja R., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Coll M. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 222. P. 721–726.
27. Gavathiotis E., Sharman G.J., Searle M.S. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 728–735.
28. Joubert A., Sun X.-W., Johansson E., Bailly C., Mann J., Neidle S. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 5984–5992.
29. Loewe H., Urbanietz J. // Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.). 1974. V. 24. P. 1927–1933.
30. Sun X.-W., Neidle S., Mann J. // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. P. 7239–7241.
31. Громыко А.В., Стрельцов С.А., Жузе А.Л. // Биоорг. химия. 2004. Т. 30. С. 446–448.
32. Macgregor H.C., Varley J.M. Working with Animal Chromosomes. J. Wiley & Sons, 1983.
33. Lin M.S., Comings D.E., Alfi O.S. // Chromosoma. 1977. V. 60. P. 15–25.
34. Hilwig I., Gropp A. // Exper. Cell Res. 1972. V. 75. P. 122–126.

35. Arndt-Jovin D.J., Jovin T.M. // *Methods Cell Biol.* 1989. V. 30. P. 417–448.
36. Синтезы органических препаратов. М.: ИЛ, 1953. Т. 4. С. 46–47.
37. Martin R.F., Pardee M., Kelly D.P., Mack P.O.-L. // *Aust. J. Chem.* 1986. V. 39. P. 373–381.
38. Rothfels K.H., Siminovich L. // *Stain Technol.* 1958. V. 33. P. 73–77.

DNA Sequence-Specific Ligands: XII. The Synthesis and Cytological Studies of Dimeric Hoechst 33258 Molecules

A. V. Gromyko*, K. V. Popov*, A. P. Mosoleva*, S. A. Streltsov*,
S. L. Grokhovsky**, V. A. Oleinikov***, and A. L. Zhuze*

Phone: (095) 135-9718; fax: (095) 135-1405; e-mail: zhuze@imb.ac.ru

* Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

** Moscow Center of Medical Research of Oslo University,
ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119991 Russia

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

We synthesized dimeric Hoechst dye molecules composed of two moieties of the Hoechst 33258 fluorescent dye phenolic hydroxy groups of which were tethered via pentamethylene, heptamethylene, or triethylene oxide linkers. A characteristic pattern of differential staining of chromosome preparations from human premonocytic leukemia HL60 cells was observed for all the three fluorescent dyes. The most contrast pattern was obtained for the bis-Hoechst analogue with the heptamethylene linker; its quality was comparable with the picture obtained in the case of chromosome staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole. The ability to penetrate into the live human fibroblasts was studied for the three bis-Hoechst compounds. The fluorescence intensity of nuclei of live and fixed cells stained with the penta- and heptamethylene-linked bis-Hoechst analogues was found to differ only slightly, whereas the fluorescence of the nuclei of live cells stained with triethylene oxide-linked bis-Hoechst was considerably weaker than that of the fixed cells. The bis-Hoechst molecules are new promising fluorescent dyes that can both differentially stain chromosome preparations and penetrate through cell and nuclear membranes and effectively stain cell nuclei. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: chromosome, dimeric Hoechst 33258 dye, DNA, fluorescent dye, minor groove ligand, synthesis