

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ НОЕЧНСТ 33258 С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ И ДНК

А. П. Антонян, М. А. Парсаданян, Н. Г. Петросян, П. О. Вардеванян*

УДК 535.372:(547.962.3+547.963.32)
<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2022-89-4-519-524>

Ереванский государственный университет,
Ереван, Армения; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

(Поступила 30 марта 2022)

Проведено исследование взаимодействия бисбензимидазольного соединения Hoechst 33258 с бычьим сывороточным альбумином крови и ДНК тимуса теленка методом флуоресцентной спектроскопии и получены спектры флуоресценции комплексов. На основании их максимумов построены зависимости интенсивностей флуоресценции комплексов этого лиганда с белком и ДНК от соотношения r = макромолекула/лиганд. Показано, что кривая в случае альбумина уменьшается при низких концентрациях белка и возрастает при его больших концентрациях; в случае ДНК кривая существенно возрастает, что обусловлено связыванием лиганда и с ДНК, и с альбумином.

Ключевые слова: ДНК, бычий сывороточный альбумин, спектр флуоресценции, Hoechst 33258.

We study the interaction of the bisbenzimidazole compound Hoechst 33258 with bovine serum albumin and calf thymus DNA by the fluorescence spectroscopy method. The fluorescence spectra of the complexes are obtained. Based on their maxima, the dependence curves of the fluorescence intensities of complexes of this ligand with protein and DNA on the ratio r = macromolecule/ligand are constructed. It is shown that the dependence curve in the case of albumin decreases at low protein concentrations and increases at its high concentrations. In the case of DNA, this curve increases significantly. This fact is due to the binding of the ligand to both DNA and albumin.

Keywords: DNA, bovine serum albumin, fluorescence spectra, Hoechst 33258.

Введение. Изучение процессов, протекающих с участием альбуминов сывороточной крови теплокровных (в том числе и человека), имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Альбумин — основной белок крови млекопитающих, его концентрация составляет 500—700 мкМ. Молекула альбумина может связывать самые разные молекулы и атомы [1, 2]. Связывая лекарства и токсические вещества, альбумин в значительной степени определяет их фармако- и токсикокинетику, транспортируя к тканям-мишеням или местам их биотрансформации. Связывание происходит по двум первичным сайтам и нескольким вторичным, их количество зависит от физико-химических свойств веществ и состояния молекулы альбумина [3—5]. Молекула сывороточного альбумина консервативна для всех млекопитающих, образована одной полипептидной цепью и состоит из трех гомологичных доменов (рис. 1) [6]. Транспорт и депонирование широкого спектра низко- или высокомолекулярных эндогенных и экзогенных соединений являются главными функциями альбумина, поэтому актуальны вопросы транспортировки биологически активных веществ, в том числе специфических к нуклеиновым кислотам (НК) лигандов к мишеням [1—6].

FLUORESCENT CHARACTERISTICS OF HOECHST 33258 COMPLEXES WITH SERUM ALBUMIN AND DNA

A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, N. H. Petrosyan, P. O. Vardevanyan* (Yerevan State University, Yerevan, Armenia; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am)

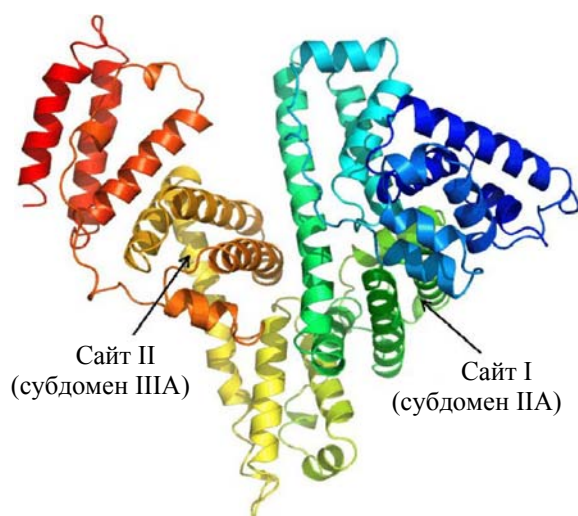
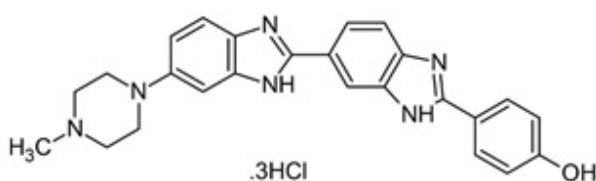


Рис. 1. Трехмерная структура альбумина

Взаимодействие этих веществ с протеинами крови, особенно с сывороточным альбумином, имеет важное биологическое значение для организма в целом. Среди НК-специфических лигандов важное значение имеет Hoechst 33258



и его производные, которые являются потенциальными противоопухолевыми препаратами и принадлежат к бензимидазольным химическим соединениям, использующимся в качестве хемотатиков при лечении опухолевых заболеваний [7—12].

Hoechst 33258 широко используется *in vivo*, являясь неинтеркалирующим лигандом, связывается в малом желобке ДНК в АТ-богатых участках, вследствие чего интенсивность его флуоресценции увеличивается. Это позволяет визуализировать хромосомную ДНК с высоким контрастом [7—16]. В работе [2] по взаимодействию Hoechst 33258 с бычьим сывороточным альбумином (БСА) показаны конформационные изменения в структуре белка в результате комплексообразования. Среди методов исследования структурно-функциональных свойств биомакромолекул (белков, НК) важное место занимает флуоресцентная спектроскопия, которая позволяет получать полезную информацию об их структуре и структуре комплексов с лигандами, а также о некоторых деталях механизмов взаимодействия, сайта связывания, конформационных изменениях [2, 17].

Цель данной работы — изучение взаимодействия Hoechst 33258 с БСА и ДНК на основании особенностей спектров флуоресценции их комплексов.

Эксперимент. Использовались БСА, ДНК тимуса телят, Hoechst 33258 (H33258) (Sigma, США), физиологический раствор, бидистиллированная вода. Концентрации белка, ДНК и Hoechst 33258 определялись спектрофотометрически, коэффициенты экстинкции $\varepsilon_{280} = 43824 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для БСА, $\varepsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для ДНК тимуса телят, $\varepsilon_{343} = 42000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для H33258.

Спектры флуоресценции H33258 и его комплексов с БСА и ДНК получены на спектрофлуориметре F96Pro Fluorescence Spectrophotometer (КНР). Возбуждение флуоресценции растворов комплексов проводилось при 343 нм, спектры флуоресценции зарегистрированы в интервале $350 \leq \lambda \leq 700 \text{ нм}$ в случае альбумина и $400 \leq \lambda \leq 600 \text{ нм}$ в случае ДНК. Данные по флуориметрическому титрованию и полученные на их основании зависимости обработаны с помощью программы Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. Флуоресцентная спектроскопия — один из высокочувствительных методов исследования структуры макромолекул и их комплексов с лигандами, поэтому для выявления особенностей связывания Н33258 с альбумином получены спектры флуоресценции их комплексов, а также спектры флуоресценции этого лиганда при комплексообразовании с ДНК (рис. 2). Для более точного выяснения особенностей связывания лиганда с макромолекулами БСА и ДНК раствор Н33258 с известной концентрацией титровался раствором макромолекул. Исходя из того, что возбуждение этого лиганда проводится при длинах волн вне поглощения биомacroмолекул (ДНК, белки), то очевидно, что при титровании вклад собственной флуоресценции альбумина или ДНК незначительный и все изменения в спектрах комплексов лиганд-макромолекула обусловлены флуоресцентными свойствами лиганда.

Для получения спектров флуоресценции возбуждение Н33258 осуществлялось излучением с $\lambda = 340$ нм, спектры флуоресценции регистрировались в интервале $350 \leq \lambda \leq 700$ нм при взаимодействии с БСА и $400 \leq \lambda \leq 600$ нм при взаимодействии с ДНК. Как видно из рис. 2, интенсивность флуоресценции Н33258 (кривая 1) при взаимодействии с БСА уменьшается при возрастании концентрации белка в растворе. Так, при изменении концентрационного соотношения $r = \text{БСА}/\text{Н33258}$ в интервале $0 \leq r \leq 1.0$ (кривые 2—6) интенсивность флуоресценции уменьшается, а при увеличении концентрации белка в растворе возрастает. При этом спектры флуоресценции комплексов Н33258-БСА при низких концентрациях белка (кривые 2—6) не сдвигаются в коротковолновую или длинноволновую область. Таким образом, флуоресценция Н33258 при комплексообразовании с БСА тушится молекулами белка по мере увеличения концентрации биомacroмолекулы до соотношения 1:1 (кривая 6). Однако при дальнейшем увеличении концентрации БСА $-1.0 < r \leq 5.0$ спектры флуоресценции сдвигаются в коротковолновую область и возрастают в максимумах. Данный эффект может быть результатом того, что при взаимодействии с Н33258 конформация БСА претерпевает определенные изменения. В частности, связывание лиганда с БСА приводит к потере α -спиральности. Это подтверждают данные, полученные нами ранее методом УФ-денатурации [16]. С этой точки зрения особенности спектров флуоресценции обусловлены тем, что Н33258 вызывает конформационные перестройки во вторичной и третичной структурах белка, в результате чего молекулы лиганда могут переходить в более гидрофобное окружение. Данный эффект может иметь место при связывании Н33258 с гидрофобными участками белка, что термодинамически выгодно, поскольку в результате потери α -спиральности белок частично разворачивается и его гидрофобные участки могут вступать в нежелательные контакты с водой. При этом за счет связывания с Н33258 участки могут эффективно экранироваться от воды [17]. Гидрофобные бензимидазольные группы также могут экранироваться от воды, что приводит к увеличению флуоресценции. Из рис. 2, б видно, что интенсивность флуоресценции Н33258 при связывании с ДНК значительно возрастает с увеличением концентрации макромолекулы, что обусловлено переходом молекул лиганда из полярного окружения в неполярную среду в более гидрофобном малом желобке ДНК. Этот переход сопровождается возрастанием интенсивности флуоресценции в случае ДНК, а в случае БСА — еще и сдвигом в коротковолновую область.

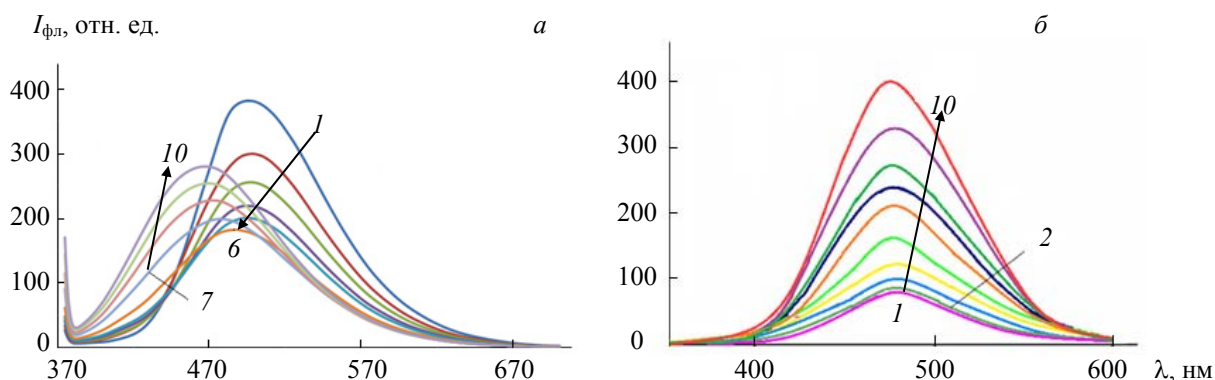


Рис. 2. Спектры флуоресценции Н33258 (1) и его комплексов (2—10) с БСА (а) и с ДНК (б)

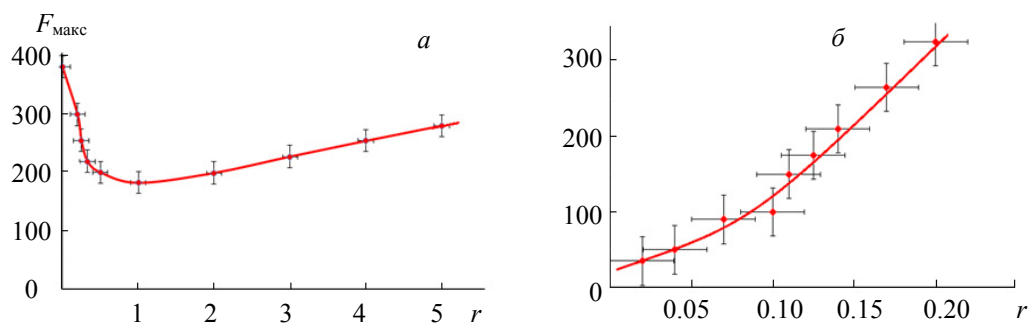


Рис. 3. Зависимость максимальных интенсивностей флуоресценции ($F_{\text{макс}}$) Н33258 и его комплексов с БСА (а) и с ДНК (б) от r

На рис. 3, а приведена зависимость максимальных интенсивностей флуоресценции комплексов Н33258 с БСА от $r = \text{БСА}/\text{Н33258}$. При низких концентрациях белка ($0 \leq r \leq 1.0$) значения $F_{\text{макс}}$ уменьшаются. По мере увеличения концентрации белка имеет место тушение флуоресценции лиганда, поскольку снижение интенсивности флуоресценции флуорофора известно как тушение. Это происходит вследствие различных процессов, в частности при реакциях в возбужденном состоянии, молекулярных перестройках, переносе энергии, образовании комплексов в основном состоянии, а также при столкновении [2]. Очевидно, тушение флуоресценции в интервале $0 \leq r \leq 1.0$ происходит в результате того, что Н33258 как ДНК-специфический лиганд образует комплексы и с белком. Уменьшение интенсивности флуоресценции Н33258 при связывании с БСА указывает на изменение полярности в непосредственном окружении связанных молекул этого лиганда. При этом тушение флуоресценции инициируется преимущественно статическим столкновением при комплексообразовании. В интервале $1.0 < r \leq 5.0$ максимумы флуоресценции комплексов Н33258-БСА возрастают, т. е. при больших концентрациях белка молекулы лиганда перемещаются в более гидрофобное окружение, вследствие чего интенсивность флуоресценции увеличивается, превалируя над тушением.

На рис. 3, б приведены зависимости максимальных интенсивностей флуоресценции комплексов Н33258 с ДНК от $r = \text{ДНК}/\text{лиганд}$. По мере увеличения концентрации ДНК кривая возрастает. Связывание лиганда с ДНК сопровождается возрастанием интенсивности флуоресценции и обусловлено тем, что Н33258 предпочтительнее локализуется в малом, более гидрофобном желобке ДНК, образует водородные связи с азотистыми основаниями, проявляя специфичность к АТ-парам. В результате молекулы Н33258 перемещаются в более недоступное для тушителей (растворенных молекул кислорода, молекул воды и растворенных ионов) окружение, что обуславливает увеличение интенсивности флуоресценции связанных с ДНК молекул этого лиганда [7].

Для оценки сродства Н33258 к БСА получена зависимость F_0/F от возрастающей концентрации альбумина (рис. 4) (кривая Штерна—Вольмера), которая увеличивается при низких концентрациях белка, затем, проходя через максимум, уменьшается. Максимум на этой кривой (и минимум на рис. 3, а) проявляется при соотношении 1:1, что указывает на существование в молекуле БСА в случае этого лиганда по крайней мере двух типов центров связывания. Ранее было показано, что Н33258 вызывает уменьшение стабильности белка в случае термической денатурации, поскольку при связывании имеют место изменения во вторичной структуре в результате образования водородных связей с аминокислотными остатками α -спиралей [16]. С учетом этого полагаем, что прямолинейные участки на рис. 3, а и рис. 4, соответствующие низким концентрациям белка, являются результатом связывания Н33258 с α -спиральными структурами БСА посредством водородных связей. Второй прямолинейный участок, соответствующий большим концентрациям белка и обусловленный возрастанием флуоресценции, вероятно, появляется в результате увеличения гидрофобности микроокружения связанных молекул лиганда. В пользу этого свидетельствует сдвиг спектров в коротковолновую область, который сопровождает возрастание интенсивности флуоресценции комплексов Н33258-БСА при больших концентрациях белка [17].

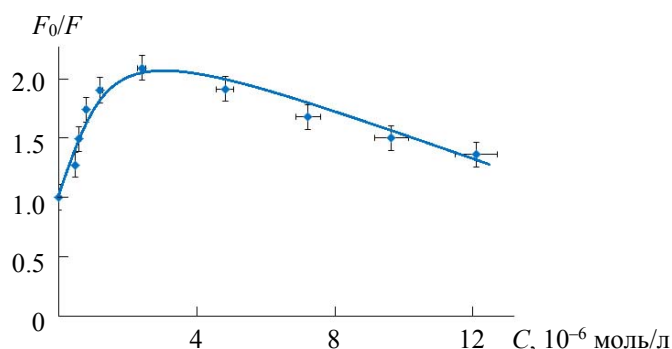


Рис. 4. Зависимость (F_0/F) тушения флуоресценции Н33258 и его комплексов с альбумином от концентрации белка при pH 7.0, $T = 298$ К

В случае ДНК интенсивность флуоресценции ее комплексов с Н33258 возрастает, что указывает на отсутствие тушения. Отметим, что константа ассоциации Н33258 с ДНК достаточно высокая (10^7 — 10^8 M^{-1}) [3—7]. Очевидно, Н33258 образует с ДНК прочные комплексы за счет гидрофобного переноса молекул лиганда из полярной среды в неполярное окружение в малом желобке ДНК, а также водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [7]. Имеется сходство флуоресцентных свойств комплексов Н33258 с БСА и ДНК при высоких концентрациях биомакромолекул. Таким образом, БСА может связываться с ДНК-специфическим лигандом, что имеет важное значение для переноса или аккумуляции этих соединений.

Заключение. Лиганды семейства Hoechst, в том числе Hoechst 33258, связываются с ДНК, локализуясь в ее малом желобке, и проявляют специфичность к АТ-парам [7, 8]. Этот лиганд с высокой специфичностью к ДНК образует также прочные комплексы с сывороточным альбумином. Исследования флуоресценции комплексов БСА-Н33258 выявили изменения интенсивности флуоресценции Н33258 в результате образования комплексов между молекулами лиганда и аминокислотными остатками α -спиралей белка.

Ранее [16] было исследовано взаимодействие Hoechst 33258 с альбумином методами УФ-плавления, абсорбционной и дифференциальной спектроскопии и выявлено, что этот лиганд вызывает конформационные изменения в структуре белка, в результате происходит разрыхление третичной структуры последнего и, как следствие, температура денатурации комплексов уменьшается. На основании абсорбционных свойств комплексов, а также результатов УФ-денатурации предположено, что связывание Hoechst 33258 с α -спиралями альбумина за счет водородных связей определяет уменьшение стабильности пространственной структуры белка. Разворачивание структуры белка в результате образования водородных связей инициирует возникновение гидрофобных взаимодействий, что проявляется сдвигом спектров флуоресценции в коротковолновую область с определенной гиперхромностью, как при связывании этого лиганда с ДНК.

Интенсивность флуоресценции Hoechst 33258 при комплексообразовании с ДНК возрастает по сравнению с интенсивностью флуоресценции свободного лиганда, и это обусловлено гидрофобным переносом его молекул из полярной водной среды в менее полярную среду в малом желобке ДНК [7—9]. Полагаем, что возрастание интенсивности флуоресценции и коротковолновый сдвиг спектров флуоресценции комплексов Hoechst 33258 с альбумином обусловлены именно образованием гидрофобных взаимодействий, что выявлено впервые. Уменьшение флуоресценции комплексов при низких и последующее возрастание при более высоких концентрациях белка обусловлены изменениями микроокружения связанных с альбумином молекул лиганда. Это указывает на существование в молекуле белка центров связывания двух типов — гидрофильного и гидрофобного. Разворачивание белковой глобулы в результате взаимодействия с Н33258 — следствие гидрофильного связывания. Конформация белка изменяется таким образом, что гидрофобные аминокислотные остатки становятся доступными для бисбензимидазольных (гидрофобных) групп лиганда. При образовании гидрофобных контактов между ними молекулы лиганда экранируются от тушителей (молекул воды, растворенного кислорода), как в случае ДНК [17]. Вследствие этого интенсивность флуоресценции связанных молекул Н33258 с биомакромолекулой возрастает, что подтверждает важную роль водородных связей и гидрофобных взаимодействий в образовании комплексов.

Установлено, что Hoechst 33258, проявляя предпочтительность к ДНК, может прочно связываться и с альбумином. Эти данные важны для понимания молекулярных основ биологического действия различных соединений на организм, а также для скрининга и дизайна специфических к той или иной макромолекуле лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке комитета по науке Республики Армения (проект № 21Т-1F063).

- [1] **A. T. Buddanavar, Sh. T. Nandibewoor.** *J. Pharm. Anal.*, **7** (2017) 148—155
- [2] **H. Ojha, Bh. M. Murari, S. Anand, M. I. Hassan, F. A. N. K. Chaudhury.** *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, N 5 (2009) 481—486
- [3] **X.-X. Zhang, Sh. L. Brantley, S. A. Corcelli, A. Tokmakoff.** *Comm. Biol.*, **3** (2020) 1—9
- [4] **A. J. Angelbello, J. L. Childs-Disney, P. Zhang, Z.-F. Wang, M. D. Disney.** *Chem. Rev.*, **118**, N 4 (2018) 1599—1663
- [5] **R. Fritzsche, P. M. Donadson, G. M. Greetham, M. Towrie, A. W. Parker, M. J. Baker, N. T. Hunt.** *Anal. Chem.*, **90**, N 4 (2018) 2732—2740
- [6] **K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablouska, A. J. Stewart.** *Mol. Immunol.*, **52**, N 3 (2012) 174—182
- [7] **J. Bucevicius, G. Lukinavicius, R. Gerasimaite.** *Chemosensors*, **6**, N 18 (2018) 1—12
- [8] **P. O. Vardevanyan, M. A. Parsadanyan, A. P. Antonyan, M. A. Shahinyan, A. T. Karapetian.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, N 4 (2021) 1519—1523
- [9] **P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, K. V. Pirumyan, A. M. Muradyan, A. T. Karapetian.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **25**, N 6 (2008) 641—646
- [10] **P. O. Vardevanyan, M. A. Parsadanyan, A. P. Antonyan, M. A. Shahinyan.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **40**, N 3 (2020) 1182—1188, doi: 10.1080/07391102.2020.1823883
- [11] **Z.-Y. Tian, Li-Na Song, Y. Zhao, F.-L. Zang, Zh.-H. Zhao, N.-H. Chen, X.-J. Xu, Ch.-J. Wang.** *Molecules*, **20** (2015) 16491—16523
- [12] **R. Choudhury, A. K. Sharma, P. Paudel, P. Wilson, A. B. Pereira.** *Anal. Biochem.*, **646**, Article N 114630, doi: 10.1016/j.ab.2022.114630
- [13] **M. Ronzetti, B. Baljinnyam, A. Yesgar, A. Simeonov.** *Expert Opinion Drug Dis.*, **13** (2018) 1005—1014
- [14] **W. Yang, C. Liu, S. Lu, S. Cheng, J. Du, Q. Gao, P. Shen, H. Luo, Y. Liu, C. Yang.** *J. Lumin.*, **192** (2017) 478—485
- [15] **S. I. Reja, L. A. Khan, V. Bhalla, M. Kumar.** *Chem. Commun.*, **52** (2016) 1182—1185
- [16] **А. П. Антонян, Н. Г. Петросян, П. О. Вардеванян.** *Журн. прикл. спектр.*, **88**, № 6 (2021) 942—947 [A. P. Antonyan, N. H. Petrosyan, P. O. Vardevanyan. *J. Appl. Spectr.*, **88**, N 6 (2021) 1210—1214]
- [17] **J. R. Lakowicz.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., University of Maryland, School of Medicine Baltimore, Maryland, USA, Printed in Singapore (KYO) (2006) 16—17