

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
КОМПЛЕКСОВ НОЕЧСТ 33258 И МЕТИЛЕННОВОГО СИНЕГО
С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

А. П. Антонян, Н. Р. Петросян, П. О. Вардеванян*

УДК 535.34:547.962.3

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2021-88-6-942-947>

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

(Поступила 24 сентября 2021)

Проведено сравнительное исследование взаимодействия бисбензимидазольного соединения Hoechst 33258 и тиазинового красителя метиленового синего (МС) с бычьим сывороточным альбумином крови (БСА) спектроскопическими методами. Получены кривые денатурации, а также спектры поглощения и дифференциальные спектры поглощения комплексов протеин-лиганд. Показано, что температура денатурации комплексов БСА с Hoechst 33258 уменьшается с увеличением концентрационного соотношения лиганд/белок, в то время как в случае МС, наоборот, увеличивается. Выявлены изменения спектров и дифференциальных спектров поглощения комплексов обоих лигандов с БСА, обусловленные связыванием этих специфических лигандов с белком. Предполагается, что при взаимодействии Hoechst 33258 с БСА происходит некоторое разрыхление компактной структуры белка в результате частичной потери спиральности α -структур, в то время как в случае МС степень упакованности пространственной структуры белка увеличивается.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, Hoechst 33258, метиленовый синий, кривая денатурации, спектр поглощения, дифференциальный спектр поглощения.

The comparative study on interaction of bisbenzimidazole compound Hoechst 33258 and thiazine dye methylene blue (MB) with bovine serum albumin (BSA) was carried out by spectroscopic methods. Denaturation curves as well as absorption spectra and differential absorption spectra of protein-ligand complexes were obtained. Denaturation temperature of albumin complexes of BSA with Hoechst 33258 was shown to decrease with the growth of concentration ratio of ligand/protein, while for MB, vice versa, denaturation temperature increases. Changes in absorption spectra and differential absorption spectra of the complexes of ligands with albumin were revealed, which result from the binding of these DNA-specific ligands to protein. It is supposed that at the interaction of Hoechst 33258 with BSA some loosening of protein compact structure occurs due to the partial loss of helicity of α -structures, while for MB an increase of the protein compact structure takes place.

Keywords: bovine serum albumin, Hoechst 33258, methylene blue, denaturation curves, absorption spectrum, differential absorption spectrum.

Введение. Механизмы функционирования белков и нуклеиновых кислот (НК) и их взаимодействие с низкомолекулярными соединениями представляют большой интерес. Взаимодействие между протеинами и биологически активными соединениями привлекает внимание исследователей с точки зрения поиска факторов, влияющих на структуру и функции белков, и механизма влияния на биологическую активность белков [1—8]. Среди различных протеинов сывороточный альбумин (СА) — один из широко исследуемых, поскольку, являясь основным белком плазмы крови, действует как пе-

COMPARATIVE STUDY OF SPECTRAL CHARACTERISTICS OF COMPLEXES OF HOECHST 33258 AND METHYLENE BLUE WITH BOVINE SERUM ALBUMIN

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

реносчик и депо для многих соединений. Бычий сывороточный альбумин (БСА) — гомологичный по структуре сывороточному альбумину человека (САЧ) [9, 10].

БСА состоит из трех линейно связанных и структурно гомологичных субдоменов, содержит два остатка триптофана, которые охватывают домены I—III [12, 13]. Сайты связывания БСА для эндогенных и экзогенных лигандов могут находиться в этих доменах, однако в большинстве случаев эти ми сайтами становятся гидрофобные полости в субдоменах II и III — так называемые участки I и II. Большинство лигандов связываются с альбумином обратимо, при этом последний в случае гидрофобных лигандов часто увеличивает их растворимость и модулирует доставку в клетки *in vivo* и *in vitro* [14]. Очевидно, понимание механизмов связывания лигандов с протеинами, скорость их доставки к мишени и терапевтическая эффективность этих процессов могут стать основой для создания, дизайна и разработки более эффективных лекарственных препаратов [15].

Среди лигандов интерес представляют ДНК-специфические, в частности, соединения семейства бисбензимидазольных, в том числе Hoechst 33258 (H33258), которые являются потенциально противоопухолевыми лекарственными препаратами. Показано [16], что H33258 и его производные могут применяться в качестве радиопротектора, чем и обусловлено широкое внимание исследователей к этому лиганду. Другой класс ДНК-специфических лигандов представляют интеркаляторы, в том числе метиленовый синий (МС) (акридиновый оранжевый и др.). Эти лиганды могут продуцировать синглетный активный кислород ($^1\text{O}_2$), который, не являясь радикалом, обладает сильной реакционной способностью в растворенном состоянии, так как проявляет предпочтительную реактивность к некоторым аминокислотным остаткам, вследствие чего широко применяется в фотодинамической терапии [17—19]. Тем не менее данные по взаимодействию H33258 и МС с протеинами, в том числе альбумином, малочисленны, к тому же до настоящего времени молекулярный механизм связывания этих лигандов с белком не установлен. В частности, в работе [16], в которой исследовано взаимодействие H33258 с БСА, показано, что при связывании этого лиганда с протеином происходят конформационные изменения в виде частичной потери α -спиральности, в результате чего температура денатурации комплекса возрастает.

В настоящей работе на основе результатов изучения взаимодействия соединения Hoechst с БСА [16] проведено сравнительное исследование особенностей взаимодействия различных по структуре и действию лигандов H33258 и МС с БСА спектроскопическими методами.

Эксперимент. Использованы БСА (66.4 кДа) (Sigma, США), H33258, МС (Sigma, США), физиологический раствор, бидистилированная вода. Концентрации БСА, H33258 и МС определяли спектрофотометрически, коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{342} = 42000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\epsilon_{668} = 76000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и $\epsilon_{280} = 43824 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для H33258, МС и БСА соответственно. Денатурацию комплексов лигандов с БСА проводили на днулучевом спектрофотометре PYE Unicam-SP8-100 (Великобритания). Нагрев термостатируемых ячеек осуществлялся с помощью программного устройства SP 876 Series 2. Изменения поглощения комплексов регистрировались при длине волны поглощения БСА $\lambda = 280 \text{ нм}$. Данные выводились на монитор ПК с помощью программного обеспечения в среде LabVIEW. На основании значений поглощения комплексов БСА с лигандом проведен количественный анализ по формуле

$$1 - \theta = \frac{A - A_{\text{глобула}}}{A_{\text{клубок}} - A_{\text{глобула}}}$$

для построения кривых денатурации (зависимость 1—9 от $t, ^\circ\text{C}$), где A — поглощение БСА при данной температуре; $A_{\text{глобула}}$ и $A_{\text{клубок}}$ — поглощение БСА в нативном и денатурированном состояниях; θ — степень денатурации.

Спектры поглощения и дифференциальные спектры поглощения H33258, МС, БСА и комплексов H33258-БСА и МС-БСА получены с помощью спектрофотометра Perkin Elmer UV-VIS Lambda 365 (США) в диапазоне 300—400 нм. Максимум поглощения H33258 соответствует $\lambda = 343 \text{ нм}$, максимум МС — $\lambda = 668 \text{ нм}$. Для получения дифференциальных спектров поглощения проведены измерения для растворов комплексов H33258-БСА и МС-БСА в сравнении с растворами H33258 и БСА, а также МС и БСА при одинаковых концентрациях лигандов в обоих растворах. Во всех экспериментах концентрационное соотношение лиганд/белок r изменяется в диапазоне $0 \leq r \leq 5.0$.

Результаты и их обсуждение. Влияние органических соединений на структуру и функции макромолекул объясняется прямым взаимодействием с последними или непрямым воздействием через растворитель. С этой точки зрения стабилизирующий или денатурирующий эффект лигандов на струк-

туру макромолекул может быть следствием образования или разрушения нековалентных связей между функциональными группами макромолекулы или их специфическими сайтами адсорбции [20, 21]. Среди лигандов интерес представляют ДНК-специфические соединения, каковыми, в частности, являются интеркаляторы или желобковые соединения. Последние, в том числе Н33258, проявляют специфичность к определенным последовательностям ДНК [22]. Как показано в [16], эти лиганды могут взаимодействовать и с протеинами, поэтому для понимания их биологической активности и транспортировки к мишени (нуклеиновым кислотам) важны исследования комплексообразования лигандов с транспортными белками, в частности с альбумином.

Один из доступных для выявления взаимодействия лигандов с макромолекулами методов — УФ-денатурация — простой и одновременно достаточно информативный. С помощью этого метода получены кривые денатурации комплексов Н33258-БСА при различных концентрационных соотношениях (рис. 1). Как видно, кривые 2 и 3 денатурации комплексов при низких соотношениях Н33258 незначительно сдвинуты относительно кривой денатурации БСА, в то время как при увеличении концентрации лиганда кривые значительно отклоняются. Аналогичные кривые получены при взаимодействии МС с БСА и схожи с полученными для комплексов МС с САЧ (поэтому не приводятся) [23]. В случае комплексов МС с альбумином кривые денатурации сдвинуты в сторону более высоких температур, в то время как в случае Н33258 кривые денатурации отклоняются в сторону низких температур [24, 25].

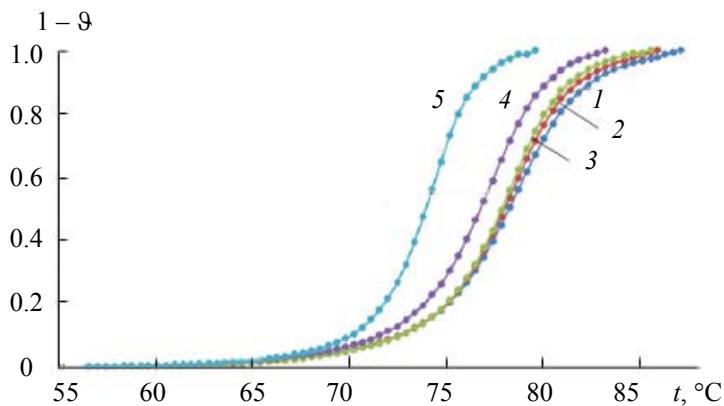


Рис. 1. Кривые денатурации БСА (1) и его комплексов с Н33258 при $r = 0$ (1), 0.02 (2), 0.1 (3), 0.2 (4) и 1.0 (5)

На рис. 2, *a* приведены спектры поглощения комплексов Н33258 с БСА. Видно, что максимумы спектров поглощения при взаимодействии Н33258 с БСА уменьшаются по мере возрастания r (кривые 1—9), т. е. ДНК-специфический лиганд Н33258 связывается с БСА, что сопровождается гипохромным эффектом, при этом степень гипохромности небольшая. На рис. 2, *б* приведены дифференциальные спектры поглощения комплексов Н33258 с БСА, которые состоят из двух пиков: положительных в интервале $300 \leq \lambda \leq 350$ нм и отрицательных в интервале $350 \leq \lambda \leq 450$ нм. При этом максимумы положительных пиков соответствуют $\lambda \approx 335$ нм, отрицательных — $\lambda \approx 380$ нм. Положительные пики дифференциальных спектров (коротковолновые) возрастают при увеличении r , в то время как отрицательные (длинноволновые), наоборот, уменьшаются. Гипохромный эффект, проявляющийся как на дифференциальных спектрах, так и на спектрах поглощения комплексов, при длине волны поглощения свободных молекул лиганда является результатом перехода его хромофорных (бензимидазольных) групп в связанное состояние. При этом имеет место небольшой гиперхромный эффект, проявляющийся в дифференциальных спектрах поглощения комплексов, с выраженным гиперхромизмом положительных и гипохромизмом отрицательных пиков. Это указывает на увеличение полярности в непосредственном окружении связанных молекул лиганда. В результате этого гидрофобные бензимидазольные группы Н33258 стремятся локализоваться в более гидрофобных ПА или ША полостях белка. Поскольку гипохромный эффект наблюдается при относительно больших длинах волн, полагаем, что молекулы этого лиганда образуют также водородные связи с аминокислот-

ными остатками α -спиралей белка, в результате чего уменьшаются параллельные диполь-дипольные взаимодействия [26]. Кроме того, температура денатурации БСА в комплексе с H33258 уменьшается, поэтому происходит частичная потеря α -спиральности полипептидных цепей БСА, вызванная связыванием H33258.

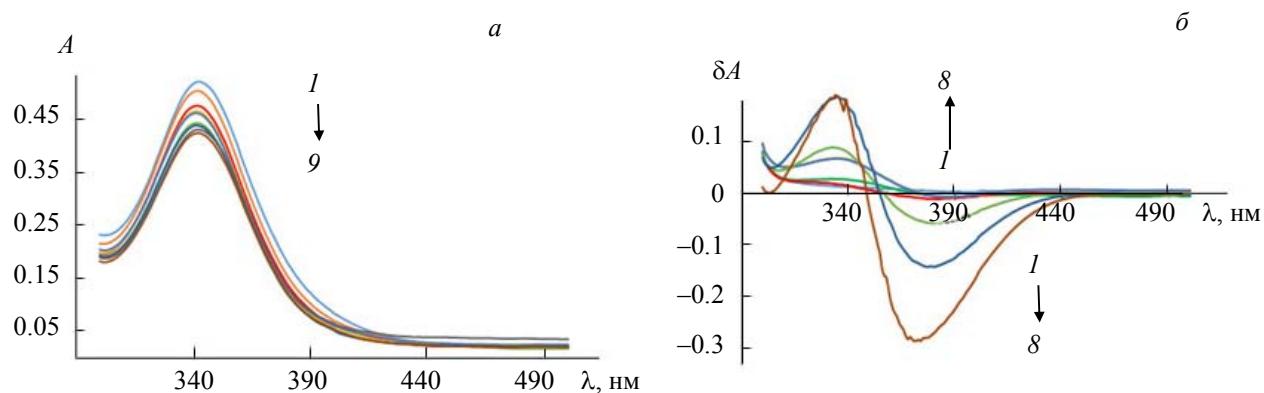


Рис. 2. Спектры поглощения (a) и дифференциальные спектры поглощения (б) H33258 (I) и его комплексов при титровании БСА (2—9); концентрация H33258 постоянная, концентрация белка возрастает в интервале $5.0 \leq r \leq 0.2$

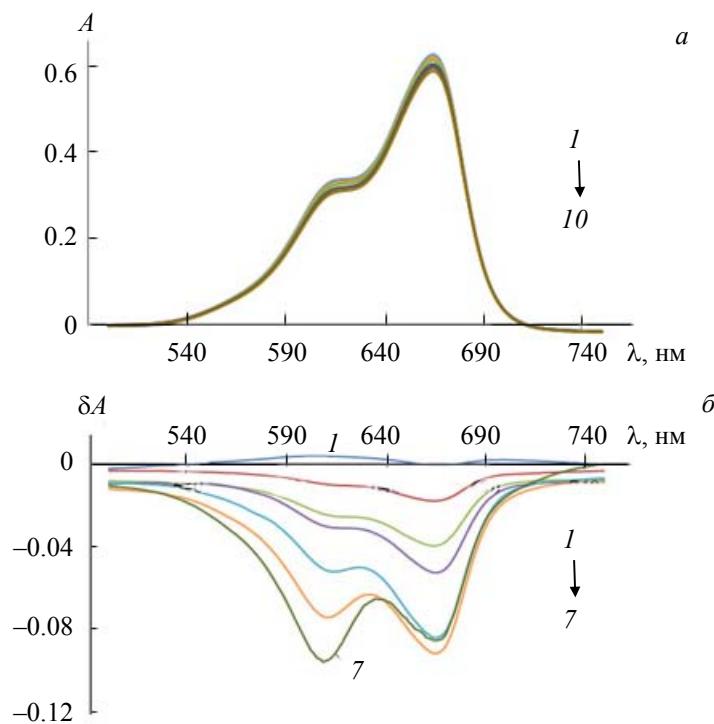


Рис. 3. Спектры поглощения (а) и дифференциальные спектры поглощения (б) МС (I) и его комплексов при титровании БСА (2—10); концентрация МС постоянная, концентрация белка возрастает в интервале $5.0 \leq r \leq 0.2$

На рис. 3 представлены спектры комплексов МС-альбумин. Как видно, интенсивность спектров поглощения комплексов уменьшается относительно спектра МС, однако их изменение небольшое (рис. 3, а). Отметим, что в случае белка изобестическая или псевдоизобестическая точка не образу-

ются в противоположность ДНК [27]. Небольшое уменьшение интенсивности максимумов спектров комплексов относительно спектра свободного МС позволяет предположить, что в связанном с белком состоянии молекулы МС остаются доступными для растворителя [28, 29]. Тем не менее монотонное уменьшение спектров поглощения комплексов по мере возрастания r указывает на то, что МС, как и H33258, связывается с БСА. В то же время абсолютные значения дифференциальных спектров поглощения уменьшаются в зависимости от r (рис. 3, б, кривые 1—6), затем уменьшение практически прекращается. Эффект проявляется при соотношении $\sim 1:1.5$ и указывает на то, что места связывания МС с БСА более ограниченны, чем центры адсорбции в случае H33258. Вероятно, молекулы МС меньших размеров, чем протяженные молекулы H33258, могут локализоваться во внутренней полости в сайте II, который находится в субъединице IIIA. Этот сайт имеет меньшую гидрофобность по сравнению с сайтом I, находящимся в субъединице IIА, тем не менее является основным центром адсорбции для МС [29]. При этом БСА претерпевает такие конформационные изменения, в результате которых центры адсорбции для МС становятся более ограниченными, чем для H33258.

Заключение. Основную роль в связывании соединения H33258 с альбумином играет гидрофобное взаимодействие между бензимидазольными группами лиганда и триптофановыми остатками бычьего сывороточного альбумина [16]. Обнаружена потеря α -спиральности альбумина при взаимодействии с Hoechst, что приводит к возрастанию температуры на 5 °C [16]. Этот эффект в [16] объясняется на основании флуоресцентных измерений, которые указывают на гидрофобные взаимодействия между лигандом и белком, а также изменениями в спектрах кругового дихроизма при денатурации. Полученные нами данные указывают на обратное, поскольку кривые плавления комплексов H33258 с альбумином сдвигаются в сторону низких температур, в результате чего температура денатурации уменьшается на ~ 4 °C. С учетом того что на дифференциальных спектрах проявляется гипсохромный сдвиг, заключаем, что потеря α -спиральности белка обусловлена образовавшимися водородными связями между лигандом и белком. На основании этого полагаем, что частичная потеря α -спиральности альбумина приводит к дестабилизации структуры белка, вследствие чего температура денатурации комплексов альбумина с Hoechst 33258 уменьшается, поскольку имеет место разворачивание трехмерной структуры протеина. Метиленовый синий локализуется во внутренней полости белка, также вызывая конформационные перестройки, что приводит к дополнительному сворачиванию белка и ограничению мест связывания для этого лиганда [29]. В результате происходит достоверное возрастание температуры денатурации, обусловленное гидрофобными эффектами, а глобулярная структура белка уплотняется и становится более стабильной. Фактически оба лиганда, связываясь с альбумином, инициируют конформационные перестройки в молекуле белка. Эти изменения имеют разнонаправленный характер, что отражается на структурной стабильности макромолекулы: в случае H33258 обнаруживается некоторое уменьшение упакованности (температура денатурации комплексов уменьшается), в то время как в случае метиленового синего, наоборот, имеет место увеличение степени упакованности пространственной структуры белка (температура денатурации возрастает) [23].

Исследование выполнено при финансовой поддержке комитета по науке Республики Армения в рамках научного проекта № 21T-1F063.

- [1] V. D. Suryawanshi, L. S. Walekar, A. H. Gore, P. V. Anbhule, G. B. Kolekar. *J. Pharm. Anal.*, **6**, N 1 (2016) 56—63
- [2] P. B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seetharamappa, S. M. T. Shaikh, Y. Jadegoud, O. B. Ijare. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41** (2006) 393—399
- [3] X. Zhu, J. Sun, Y. Hu. *Anal. Chim. Acta*, **596** (2007) 298—302
- [4] V. D. Suryawanshi, P. V. Anbhule, A. H. Gore, S. Patil, G. Kolekar. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **51** (2012) 95—102
- [5] X. M. He, D. C. Carter. *Nature*, **358** (1992) 209—215
- [6] U. S. Mote, S. L. Bhattar, S. R. Patil, G. B. Kolekar. *Luminescence*, **25** (2010) 1—8
- [7] Y. Q. Wang, H. M. Zhang, G. C. Zhang, W. H. Tao, Z. H. Fei, Z. T. Liu. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43** (2007) 1869—1875
- [8] V. Anbazhagan, R. Renganathan. *J. Lumin.*, **128** (2008) 1454—1458
- [9] Y. Moriyama, D. Ohta, K. Hachiya, Y. Mitsui, K. Takeda. *J. Protein Chem.*, **15** (1996) 265—272
- [10] G. J. Quinlan, G. S. Martin, T. W. Evans. *Hepatology*, **41**, N 6 (2005) 1211—1219
- [11] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade. *Mol. Pharmacol.*, **11**, N 6 (1975) 824—832

- [12] **U. Kragh-Hansen, V. T. Chuang, M. Otagiri.** Biol. Pharm. Bull., **25**, N 6 (2002) 695—704
- [13] **M. T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam, K. A. Howard.** Mol. Cell. Therapies, **4** (2016) 1—8
- [14] **D. E. Epps, Th. J. Raub, V. Caiolfa, A. Chiari, M. Zamai.** J. Pharm. Pharmacol., **51** (1999) 41—48
- [15] **B. Saha, S. Chowdhury, D. Sanyal, K. Chattopadhyay, G. S. Kumar.** ACS Omega, **3**, N 3 (2018) 2588—2601
- [16] **H. Ojha, Bh. M. Murari, S. Anand, M. I. Hassan, F. A. N. K. Chaudhury.** Chem. Pharm. Bull., **57**, N 5 (2009) 481—486
- [17] **D. Severino, H. C. Junqueira, M. Gugliotti, D. S. Gabrielli, M. S. Baptista.** Photochem. Photobiol., **77**, N 5 (2003) 459—468
- [18] **D. Gabrielli, E. Belisle, D. Severino, A. J. Kowaltowski, M. S. Baptista.** Photochem. Photobiol., **79**, N 3 (2004) 227—232
- [19] **J. P. Tardivo, A. D. Giglio, C. S. d. Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. d. F. t. Turchiello, M. S. Baptista.** Photodiagn. Photodyn. Ther., **2**, N 3 (2005) 175—191
- [20] **Y. S. N. Day, D. G. Myszka.** J. Pharm. Sci., **92**, N 2 (2003) 333—343
- [21] **Y. Li, Y. Zhang, Sh. Sun, A. Zhang, Y. Liu.** Photochem. Photobiol. B: Biology, **128** (2013) 12—19
- [22] **R. Kakkar, Suruchi, R. Grover.** J. Biomol. Struct. Dyn., **23** (2005) 37—47
- [23] **P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, M. A. Shahinyan, N. H. Petrosyan.** J. Biomol. Struct. Dynam., Pub. Date: 17.03.21 (2021) 1—8, doi: 10.1080/07391102.2021.1902397
- [24] **P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, M. A. Shahinyan, M. S. Mikaelyan.** Biophys. Rev. Lett., **14**, N 1 (2019) 17—25
- [25] **P. O. Vardevanyan, M. S. Mikaelyan, N. H. Petrosyan.** Proc. YSU, Chem. Biol., **54**, N 3 (2020) 204—208
- [26] **Ч. Кантор, П. Шиммель.** Биофизическая химия, в 3 т., пер. с англ. **2**, Москва, Мир (1984)
- [27] **П. О. Вардеванян, А. П. Антоян, М. А. Парсаданян, М. А. Шагинян, Л. А. Амбарцумян.** Журн. прикл. спектр., **80**, N 4 (2013) 610—614 [P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, M. A. Shahinyan, L. A. Hambardzumyan. J. Appl. Spectr., **80** (2013) 595—599]
- [28] **E. Alarcon, A. M. Edwards, A. Aspee, F. E. Moran, C. D. Borsarelli, E. A. Lissi, D. Gonzalez-Nilo, H. Poblete, J. C. Scaiano.** Photochem. Photobiol. Sci., **9** (2010) 93—102
- [29] **L. L. He, Y. X. Wang, X. X. Wu, X. P. Liu, X. Wang, B. Liub, X. Wang.** Luminescence, **30** (2015) 1380—1388