



УДК 577.113.7:547.785.5.057

ДНК-СПЕЦИФИЧНЫЙ ДИМЕРНЫЙ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛ

© 2004 г. А. В. Громыко, С. А. Стрельцов, А. Л. Жузе*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 01.03.2004 г. Принята к печати 09.03.2004 г.

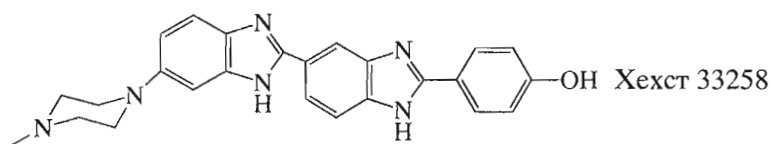
Осуществлен синтез димерного аналога флуоресцентного красителя Хехст 33258. Продемонстрирована его способность дифференциально окрашивать препараты хромосом человека и связываться с двунитовой ДНК.

Ключевые слова: бисбензимидазол, синтез; ДНК, узкобороздочный лиганд; хромосома, флуоресцентный краситель.

Сайт-специфичное узнавание последовательностей ДНК небольшими органическими молекулами имеет важное значение для ориентирования таких молекул на определенные гены в геноме и для использования их в химиотерапии. В противовирусной терапии и в химиотерапии рака наблюдается отход от традиционных лекарств, разрушающих ДНК неселективным способом, к новым агентам, которые влияют на процессы репликации и транскрипции ДНК, взаимодействуя с ДНК нековалентно. В настоящее время наибольший

интерес представляет конструирование низкомолекулярных лигандов, связывающихся нековалентно и сайт-специфично с узкой бороздкой В-формы ДНК. Такие соединения могли бы служить инструментами или терапевтическими агентами для контроля экспрессии генов в клетках.

Для создания нового типа сайт-специфичных лигандов в качестве исходного соединения был выбран краситель Хехст 33258, используемый в цитологии в качестве ДНК-специфичной флуоресцентной метки.



Известно, что Хехст 33258 ингибирует взаимодействие ТАТА-бок-связывающего белка с ДНК [1], является эффективным ингибитором ДНК-топоизомеразы I [2] и ДНК-хеликаз [3], а также обладает радиопротекторным свойством [4]. Молекулы Хехст 33258, связываясь нековалентно с В-формой ДНК, “узнают” при связывании три последовательно расположенные АТ-пары в узкой бороздке ДНК, накрывая при этом 4–5 п. о. [5–7].

Для создания более специфичного соединения, узнающего на ДНК два блока из трех АТ-пар и накрывающего при этом один виток двойной спирали ДНК, был осуществлен синтез димерного бисбензимидазола (III, DBVI), состоящего из двух молекул Хехст 33258, связанных пентаметиленовым мостиком (схема).

Для создания DBVI были апробированы три метода синтеза. Окислительная конденсация с по-

мощью *n*-бензохинона 2-(3,4-диаминофенил)-6-(1-метил-4-пиперазинил)бензимидазола (I) [8] с диальдегидом (IIa) и конденсация соединения (I) с диметилловым эфиром (IIб) в присутствии P₂O₅ в метансульфокислоте [9] были малоэффективны. Наилучшим оказался метод конденсации диамина (I) с диимидатом (IIв) (кипячение 20 мин в уксусной кислоте в атмосфере азота). Диимидат (IIв) был получен по реакции Пиннера из соответствующего динитрила. Последний был синтезирован при алкилировании в диметилформамиде алкоголята *n*-гидроксibenзонитрила 1,5-дибромпентаном.

DBVI был получен с выходом 28% в виде кристаллов желтого цвета (т. пл. >350°C), имел λ_{max} 342 нм (ε₃₄₂ 70000 М⁻¹ см⁻¹) в 1 мМ какодилатном буфере (рН 6.8) в присутствии 10% DMSO (по объему) и обладал желто-зеленой флуоресценцией. Спектр ¹H-ЯМР DBVI регистрировали на приборе AMX-400 (Bruker, Германия) в DMSO-*d*₆ при 23°C (δ, м.д.; J, Гц); рабочая радиочистота 400.0 МГц;

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

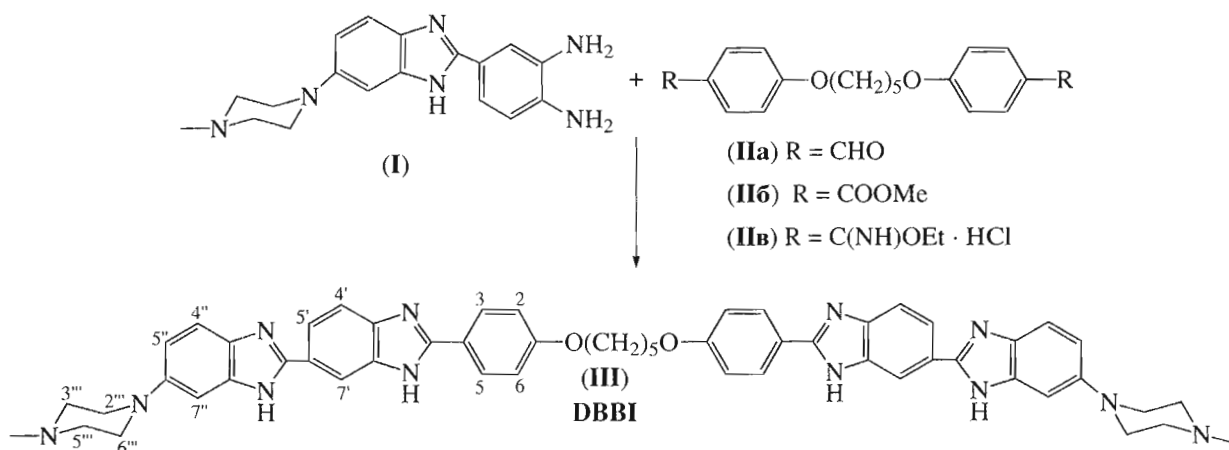


Схема синтеза димерного бисбензимидазола – DBVI.

внутренний стандарт – сигнал DMSO-*d*₆: 1.64 (2 H, м, OCH₂CH₂CH₂); 1.86 (4 H, м, 2 × OCH₂CH₂); 2.86 (налагающиеся сигналы 2 × NCH₃, 6 H); 3.2–3.9 (16 H, м, 4 × (H2''', H3''', H5''', H6''')); 4.16 (4 H, м, 2 × OCH₂); 7.18 (4 H, д, *J* 8.1, H2, H6); 7.22 (2 H, с, H7''), 7.33 (2 H, д, *J* 8.7, H5''); 7.69 (2 H, д, *J* 8.7, H4''); 7.92 (2 H, д, *J* 8.7, H4'); 8.26 (2 H, д, *J* 8.7, H5'); 8.30 (4 H, д, *J* 8.1, H3, H5); 8.64 (2 H, с, H7'). Отнесение сигналов в спектре ¹H-ЯМР было сделано на основе данных работы [10]. Масс-спектр DBVI получен на времяпролетном приборе КОМПАКТ MALDI 4 (KRATOS Analytical, Великобритания) в линейном режиме регистрации положительных ионов; матрица – 2,5-дигидроксибензойная кислота; N₂-лазер, 337 нм. Масс-

спектр, *m/z*: 918.6 [*M* + H]⁺, рассчитано 917.1 (C₅₅H₅₆N₁₂O₂).

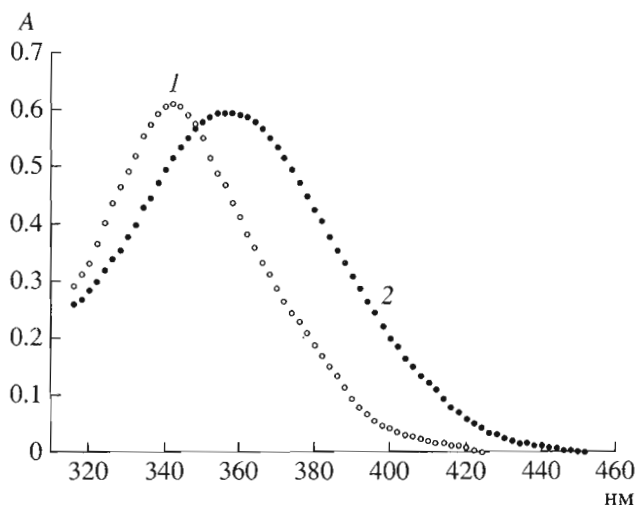
Исследовано взаимодействие DBVI с ДНК из тимуса теленка (Sigma, США). При добавлении ДНК максимум поглощения DBVI смещается от 342 к 356 нм с одновременным небольшим падением поглощения (рисунок). Наличие спектральных изменений у лиганда в присутствии ДНК свидетельствует об образовании ими комплекса.

Проведено цитологическое исследование DBVI в качестве флуоресцентного красителя ДНК. На препаратах хромосом человека, окрашенных DBVI, выявляется дифференциальный рисунок, подобный G-окраске (поперечная исчерченность хромосом). DBVI оказался перспективным флуоресцентным красителем для окрашивания препаратов хромосом при проведении процедуры флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), поскольку контрастность окрашивания хромосом у него выше, чем у Хехст 33258. В дальнейшем планируется изучение сайт-специфичности DBVI на фрагментах ДНК с помощью ДНКазы I и исследование DBVI в качестве ингибитора каталитической активности ДНК-топоизомеразы I человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам ИМБ РАН К.В. Попову – за цитологическое тестирование DBVI, А.А. Стомахину – за съемку масс-спектра и А.П. Мозоловой – за съемку ¹H-ЯМР-спектра.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 04-03-33144).



Спектры поглощения DBVI в отсутствие (1) и в присутствии ДНК из тимуса теленка (2). Концентрация DBVI – 8.63×10^{-6} М, концентрация ДНК – 7.7×10^{-7} М п. о. Буфер – 1 мМ какодилат натрия (рН 6.8), в присутствии 10% DMSO (по объему); температура 20°C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chiang S.-Y., Welch J., Rauscher F.J. III, Beerman T.A. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 7033–7040.

2. *Chen A.Y., Chiang Y., Gatto B., Liu L.F.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 8131–8135.
3. *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.
4. *Lybimova N.V., Coutlas P.G., Yuen K., Martin R.F.* // Brit. J. Radiol. 2001. V. 74. P. 77–82.
5. *Михайлов М.В., Заседателев А.С., Крылов А.С., Гурский Г.В.* // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. С. 690–705.
6. *Teng M.-K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H.-J.* // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 2671–2690.
7. *Parkinson J.A., Barber J., Douglas K.T., Rosamond J., Sharples D.* // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 10181–10190.
8. *Loewe H., Urbanietz J.* // Arzneim.-Forsch. (Drug Res.). 1974. V. 24. P. 1927–1933.
9. *Sun X.-W., Neidle S., Mann J.* // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. P. 7239–7241.
10. *Martin R.F., Pardee M., Kelly D.P., Mack P.O.-L.* // Aust. J. Chem. 1986. V. 39. P. 373–381.

A DNA-Specific Dimeric Bisbenzimidazole

A. V. Gromyko, S. A. Streltsov, and A. L. Zhuze[#]

[#]Phone: +7 (095) 135-9718; e-mail: zhuze@imb.ac.ru

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

A dimeric analogue of the fluorescent dye Hoechst 33258 was synthesized. It was shown to differentially stain human chromosome preparations and bind to double-stranded DNAs. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: bisbenzimidazole, synthesis; chromosome, fluorescent dye; DNA, minor-groove binding ligand

Сдано в набор 30.03.2004 г.

Подписано к печати 27.05.2004 г.

Формат бумаги 60 × 88^{1/8}

Офсетная печать

Усл. печ. л. 14.0

Усл. кр.-отт. 3.6 тыс.

Уч.-изд. л. 14.0

Бум. л. 7.0

Тираж 250 экз.

Зак. 8415

Учредители: Российская академия наук,
Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Адрес издателя: 117997, Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”

Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099, Москва, Шубинский пер., 6