

## СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ НОЕCHST 33258 С БСА

Антонян А.П., Карапетян А.Г., Петросян Н.Г., Варdevanyan П.О.

Ереванский государственный университет

ул. А. Манукяна, 1, г. Ереван, 0025, Армения; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0511

**Аннотация.** Проведено исследование по взаимодействию ДНК-специфического соединения Hoechst 33258 с бычьим сывороточным альбумином крови (БСА) методами абсорбционной, дифференциальной и флуоресцентной спектроскопий. На основании спектров поглощения и флуоресценции комплексов этого лиганда с БСА, в широком интервале изменения  $\gamma$  ( $\gamma$ =лиганд/альбумин), построены кривые зависимости относительных изменений максимумов поглощения ( $A/A_0$ ) и флуоресценции ( $F/F_0$ ) комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы. В результате образования комплексов кривая зависимости  $A/A_0$  монотонно уменьшается с увеличением концентрации протеина. Выявлено, что кривая зависимости  $F/F_0$  не прямолинейная и состоит из двух участков: при низких концентрациях белка эта кривая линейно уменьшается, и проходя через точку минимума, при относительно больших концентрациях белка начинает линейно расти. Выявлено, что дифференциальные спектры комплексов Н33258-БСА характеризуются гипо- или гиперхромным эффектами и гипсохромным сдвигом: при низких концентрациях белка имеет место гипсохромный эффект, при более высоких концентрациях белка (начиная с определенных соотношений лиганд/альбумин  $\sim 1:1$ ), дифференциальные спектры претерпевают гипсохромный сдвиг с гиперхромным эффектом. Полученные данные выявляют, что Hoechst 33258, являясь ДНК-специфическим лигандом, прочно связывается с альбумином.

**Ключевые слова:** Hoechst 33258, бычий сывороточный альбумин, комплексообразование, спектры, спектроскопические методы.

Транспортировка биологически активных веществ в организме к мишеням в настоящее время является одной из актуальных задач молекулярной биофизики. С этой точки зрения, исследование процессов с участием альбуминов сывороточной крови приобретает не только их фундаментальное, но и прикладное значение, связанное с необходимостью определения факторов, влияющих на структуру и функции белков и на биологическую активность как макромолекул, так и лигандов [1-7].

Среди ДНК-специфических лигандов большой интерес представляют вещества семейства Hoechst (в числе которых, Hoechst 33258 (рис. 1)). Эти вещества широко используются в качестве *in vivo* флуоресцентных красителей ДНК, связываются в малом желобке ДНК в АТ-богатых участках, при этом, интенсивность флуоресценции резко возрастает [8-13].

Hoechst 33258 (Н33258) является потенциально противоопухолевым лекарственным препаратом, применяется в качестве радиопротектора [8-13].

Целью данной работы явилось исследование особенностей связывания Н33258 с БСА спектроскопическими методами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались бычий сывороточный альбумин (БСА), Hoechst 33258 (Н33258) (“Sigma”, USA), физиологический раствор, бидистиллированная вода. Концентрации белка и Hoechst 33258 определялись спектрофотометрически, с использованием следующих коэффициентов экстинкции:  $\epsilon_{280}=43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для БСА,  $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для Н33258.

Спектры флуоресценции Н33258 и его комплексов с альбумином и ДНК получены на спектрофлуориметре F96Pro Fluorescence Spectrophotometer (КНР). Возбуждение растворов комплексов проводилось при 343нм, спектры флуоресценции регистрировались в интервале  $350 \leq \lambda \leq 700$  нм. Спектры поглощения и дифференциальные спектры Н33258, БСА и Н33258-БСА комплексов получены с помощью спектрофотометра Perkin Elmer UV-VIS Lambda 365 (США), в интервале изменения длины волны 300-400 нм. Максимум поглощения Н33258 соответствовал длине волны 343 нм. Для получения дифференциальных спектров поглощения растворы Н33258-БСА комплексов были измерены против растворов Н33258 и БСА, при

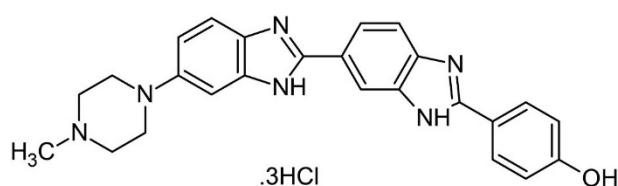


Рисунок 1. Химическая структура Hoechst 33258

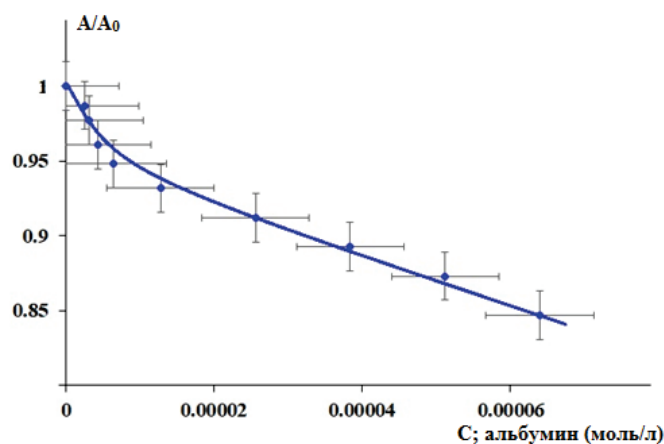
одинаковых концентрациях указанных лигандов в обоих растворах. Во всех экспериментальных измерениях приведено концентрационное соотношение  $\gamma$ , где  $\gamma$  - лиганд/белок соотношение, которое изменялось в интервале  $0 \leq \gamma \leq 5,0$ .

Данные спектроскопических титрований, все спектры и полученные на их основании кривые зависимостей обработаны программой Excel.

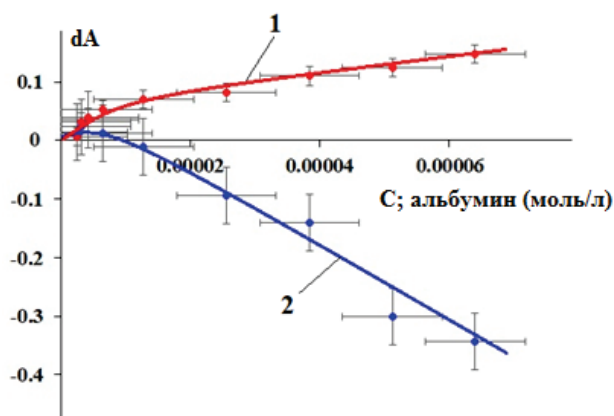
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по взаимодействию Н33258 с БСА проводились методами абсорбционной, дифференциальной и флуоресцентной спектроскопии. При спектроскопических исследованиях растворы лиганда с постоянной концентрацией титровались раствором альбумина и на основании соответствующих спектров (которые не приведены) получены их относительные изменения в зависимости от концентрации белка. На рисунке 2 приведена кривая зависимости относительного изменения максимумов поглощения ( $A/A_0$ ) комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы. Эта кривая уменьшается с увеличением концентрации протеина, что указывает на то, что лиганд связывается с альбумином и, по мере возрастания концентрации последнего, все больше молекул Н33258 переходят в связанное состояние. В результате этого концентрация свободных молекул лиганда в растворе уменьшается, что и приводит к уменьшению поглощения лиганда. Отметим, что при титровании учтено разбавление, влияние которого незначительное и им можно пренебречь.

Получены также дифференциальные спектры поглощения комплексов Н33258-БСА (спектры не приводятся), однако на их основании нельзя построить их относительное изменение в силу того, что  $dA_0$  имеет нулевое значение. Поэтому на рисунке 2 приведены кривые зависимости максимумов дифференциальных спектров от концентрации белка. Необходимо отметить, что на дифференциальных спектрах поглощения комплексов Н33258-БСА образуются отрицательная полоса в интервале изменения длины волны  $350 \leq \lambda \leq 450$  нм, и положительная полоса в интервале  $300 \leq \lambda \leq 350$  нм. При этом, отрицательная полоса характеризуется гипо-, гиперхромным эффектом. Фактически, дифференциальные спектры комплексов характеризуются тем, что помимо гипо- или гиперхромного эффекта, также претерпевают гипсохромный сдвиг: при низких концентрациях белка имеет место гипохромный эффект, а при более высоких концентрациях белка (начиная с определенных соотношений лиганд/альбумин  $\sim 1:1$ ), дифференциальные спектры претерпевают гипсохромный сдвиг с гиперхромным эффектом [14]. Дифференциальные спектры по сути являются не абсолютным, а относительным поглощением лиганда, поэтому, кривые зависимости их отрицательных и положительных пиков от концентрации, полученные в работе [14], приводятся для наглядности на рис. 3. Из приведенного рисунка видно, что кривая 1, соответствующая положительным пикам (коротковолновые пики в результате гиперхромного эффекта на дифференциальных кривых), возрастает с увеличением концентрации альбумина. Кривая 2 (соответствует отрицательным пикам на дифференциальных спектрах) уменьшается [14]. На основании указанных особенностей изменений дифференциальных спектров мы полагаем, что Н33258 с альбумином связывается по крайней мере двумя способами: изменения при относительно длинных волнах являются результатом образования водородных связей с аминокислотными остатками  $\alpha$ -спиралей белка, что приводит к уменьшению параллельных диполь-дипольных взаимодействий между пептидными группами. Второй способ соответствует гидрофобному взаимодействию, поэтому и имеет место гипсохромный сдвиг (результат изменения полярности микроокружения молекул лиганда), и гиперхромный эффект. Этот факт подтверждается на основании флуоресцентных исследований [15]. На флуоресцентных спектрах комплексов Н33258-БСА также наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции при длине волны свечения лиганда (около 500 нм), при низких концентрациях белка, и гипсохромный сдвиг с увеличением интенсивности флуоресценции при более коротких длинах волн (около 470 нм).



**Рисунок 2.** Кривая зависимости относительного изменения максимумов поглощения ( $A/A_0$ ) комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы

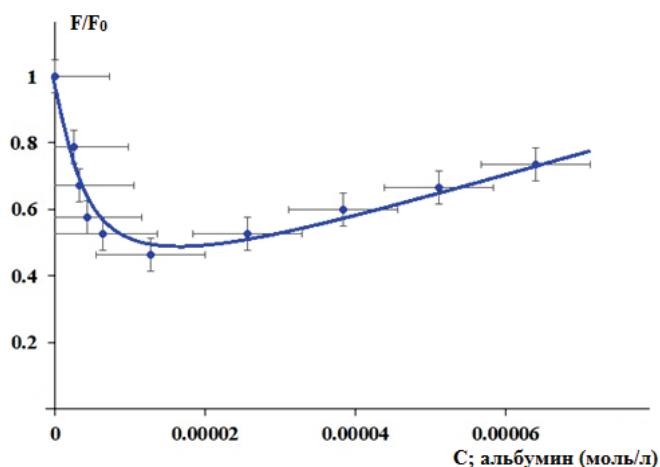


**Рисунок 3.** Кривая зависимости максимумов дифференциальных спектров комплексов Н33258-БСА от концентрации белка [13]

На основании максимумов спектров флуоресценции комплексов Н33258-БСА построена кривая зависимости  $F/F_0$  от концентрации белка, которая приведена на рисунке 4. Как видно из рисунка, эта кривая не прямолинейная и состоит из двух участков: при низких концентрациях белка эта кривая фактически линейно уменьшается, а при относительно больших концентрациях белка начинает линейно расти. Примечательно, что минимум на этой кривой соответствует концентрационному соотношению белок/лиганд  $\approx 1$ .

Эти особенности указывают на то, что флуоресценция Н33258 при комплексообразовании с альбумином тушится молекулами белка по мере увеличения концентрации биомолекулы вплоть до соотношения 1:1. Однако, при дальнейшем увеличении концентрации альбумина –  $1,0 < \text{белок/лиганд} \leq 5,0$ , спектры флуоресценции сдвигаются в коротковолновую область и возрастают в максимумах. Этот эффект указывает на то, что при взаимодействии с Н33258 конформация альбумина претерпевает определенные изменения: по всей вероятности, уже при достаточно низких концентрациях Н33258 вызывает конформационные перестройки в пространственной структуре белка таким образом, что для его молекул доступными становятся более гидрофобные участки протеина. Очевидно, что этот эффект может иметь место вследствие потери  $\alpha$ -спиральности белка в результате чего его гидрофобные участки могут вступать в нежелательные контакты с водой, поэтому, за счет связывания с Н33258 эти участки могут эффективно экранироваться от воды [16]. В свою очередь, гидрофобные бензимидазольные группы также могут экранироваться от воды, что и приводит к увеличению флуоресценции.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что этот лиганд образует прочные комплексы с сывороточным альбумином. Примечательно, что этот лиганд образует комплексы с альбумином посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий, которые выявляются с помощью методов дифференциальной и флуоресцентной спектроскопии. В результате образования водородных связей между молекулами Н33258 и аминокислотными остатками  $\alpha$ -спиралей белка происходит частичное разворачивание его структуры [13], а в результате гидрофобных взаимодействий имеет место возрастание интенсивности флуоресценции Н33258-альбумин комплексов. Одновременное проявление этих взаимодействий приводит к разрушению структуры белка и к потере стабильности третичной структуры [14].



**Рисунок 4.** Кривая зависимости  $F/F_0$  комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы

Полученные данные выявляют, что сывороточный альбумин может связывать и ДНК-специфические лиганды, что может иметь важное значение для переноса или аккумуляции этих веществ. Эти данные также важны для понимания молекулярных основ биологического действия различных соединений на организм и могут лечь в основу скрининга и дизайна для более эффективных лекарственных препаратов.

#### Список литературы / References:

1. Suryawanshi V.D., Walekar L.S., Gore A.H., Anbhule P.V., Kolekar G.B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, vol. 6, no. 1, doi: 10.1016/j.jpba.2015.07.001.
2. Kandagal P.B., Ashoka S., Seetharamappa J., Shaikh S.M.T., Jadegoud Y., Ijare O.B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, vol. 41, doi: 10.1016/j.jpba.2005.11.037.
3. Zhu X., Sun J., Hu Y. Determination of protein by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescence probe. *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 596, doi: 10.1016/j.aca.2007.06.008.
4. Suryawanshi V.D., Anbhule P.V., Gore A.H., Patil S., Kolekar G. Spectroscopic Investigation on the Interaction of Pyrimidine Derivative, 2-Amino-6-hydroxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-pyrimidine-5-carbonitrile with Human Serum Albumin: Mechanistic and Conformational Study. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2012, vol. 51, doi: 10.1021/ie202005c.
5. He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 1992, vol. 358, doi: 10.1038/358209a0.
6. Mote U.S., Bhattar S.L., Patil S.R., Kolekar G.B. Interaction between felodipine and bovine serum albumin: Fluorescence quenching study. *Luminescence*, 2010, vol. 25, doi: 10.1002/bio.1130.
7. Wang Y.Q., Zhang H.M., Zhang G.C., Tao W.H., Fei Z.H., Liu Z.T. Spectroscopic studies on the interaction between silicotungstic acid and bovine serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, vol. 43, doi: 10.1016/j.jpba.2007.01.001.
8. Anbazhagan V., Renganathan R. Study on the binding of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J. Lumin.*, 2008, vol. 128, doi: 10.1016/j.jlumin.2008.02.004.
9. Holmgaard List N., Knoops J., Rubio-Magnieto J., Ide J., Beljonne D., Norman P., Surin M., Linares M. Origin of DNA-induced circular dichroism in a minor-groove binder. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, vol. 139, doi: 10.1021/jacs.7b05994.
10. Bucevicius J., Lukinavicius G., Gerasimaite R. The use of Hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors*, 2018, vol. 6, no. 18, doi: 10.3390/chemosensors6020018.
11. Zhang X.X., Brantley Sh.L., Corcelli S.A., Tokmakoff A. DNA minor-groove binder Hoechst 33258 destabilizes base-pairing adjacent to its binding site. *Comm. Biol.*, 2020, vol. 3, doi: 10.1038/s42003-020-01241-4.
12. Angelbello A.J., Chen J.L., Childs-Disney J.L., Zhang P., Wang Z.F., Disney M.D. Using genome sequence to enable the design of medicines and chemical probes. *Chem. Rev.*, 2018, vol. 118, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00504.
13. Ojha H., Murari Bh.M., Anand Sn., Hassan M.I., Ahmad F., Chaudhury N.K. Interaction of DNA Minor Groove Binder Hoechst 33258 with Bovine Serum Albumin. *Chem. Pharm. Bull.*, 2009, vol. 57, no. 5, doi: 10.1248/cpb.57.481.
14. Антонян А.П., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Сравнительное исследование спектральных характеристик комплексов Hoechst 33258 и МС с БСА. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2021, т. 88, № 6. [Antonyan A.P., Petrosyan N.R., Vardevanyan P.O. Comparative study of spectral characteristics of Hoechst 33258 and MS complexes with BSA. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2021, vol. 88, no. 6, doi: 10.47612/0514-7506-2021-88-6-942-947. (In Russ.)]
15. Антонян А.П., Парсаданян М.А., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Флуоресцентные характеристики комплексов Hoechst 33258 с сывороточным альбумином и ДНК. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2022, т. 89, № 4. [Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Petrosyan N.R., Vardevanyan P.O. Fluorescent characteristics of Hoechst 33258 complexes with serum albumin and DNA. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2022, vol. 89, no. 4. (In Russ.)]
16. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition.* Maryland: University of Maryland, School of Medicine Baltimore, 2006.

## SPECTRAL CHARACTERISTICS OF THE COMPLEXES OF HOECHST33258 WITH BSA

Antonyan A.P., Karapetyan A.G., Petrosyan N.G., Vardevanyan P.O.

Yerevan State University

A. Manoogian str., 1, Yerevan, 0025, Armenia; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0511

**Abstract.** Study on the interaction of DNA-specific compound Hoechst 33258 with bovine serum albumin (BSA) has been carried out, using the methods of absorption, differential and fluorescence spectroscopies. On the basis of the absorption and fluorescence spectra of the complexes of this ligand with BSA, in wide interval of the change of  $r$  ( $r$ =ligand/albumin), the dependence curves of the relative changes of the absorption ( $A/A_0$ ) and fluorescence ( $F/F_0$ ) maxima of the complexes H33258-BSA on the macromolecule concentration, were constructed. The dependence curve of  $A/A_0$  monotonously decreases along with protein concentration increasing due to the formation of the complexes. It was revealed that the dependence curve of  $F/F_0$  is not linear and is consisted of two regions: at low concentrations of the protein this curve decreases linearly, and passing through the minimum point, at relatively high concentrations of the protein starts linearly increasing. It was also shown that the differential spectra of the complexes H33258-BSA are characterized by hypo- and hyperchromic effects and hypsochromic shift: at low concentrations of the protein a hypochromic effect occurs, at higher concentrations of the protein (beginning from the certain ratios ligand/albumin  $\sim 1:1$ ), the differential spectra are hypsochromically shifted with hyperchromic effect. The obtained data find out that Hoechst 33258, being DNA-specific ligand, tightly binds to albumin.

**Key words:** Hoechst 33258, bovine serum albumin, complex-formation, spectra, spectroscopic methods.