



УДК 577.2

СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ К АТ-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ДНК РАЗЛИЧНОГО НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА, ОПРЕДЕЛЕННАЯ С ПОМОЩЬЮ ФУТПРИНТИНГА

© 2025 г. Д. С. Набережнов*, **, А. Ф. Арутюнян*, А. Д. Бениаминов*,
Н. М. Смирнов*, Д. Н. Калюжный*, А. Л. Жузе*, О. Ю. Сусова*, **, #

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

** “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России,
Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Поступила в редакцию 15.12.2024 г.

После доработки 24.12.2024 г.

Принята к публикации 26.12.2024 г.

Сайт-специфичность связывания с ДНК трех серий узкобороздочных лигандов – димерных бисбензимидазолов $DB_2(n)$, $DB_2P(n)$ и $DB_2Py(n)$ – впервые определена методом футпринтинга с ДНКазой I. Соединения состоят из двух бисбензимидазольных блоков, соединенных между собой олигометиленовыми линкерами различной длины (n). У $DB_2(n)$ и $DB_2P(n)$ общий мономер MB_2 представляет собой аналог Hoechst 33342, в котором удалено гидрофобное этоксифенильное ядро и на его место введена гидрофильная аминометиленовая группа. В состав структуры молекул серии $DB_2Py(n)$ входят два бензимидазольных кольца и одна пирролкарбоксамидная группа, являющаяся структурной единицей антибиотика нетропсина, специфичного к АТ-последовательностям ДНК. Показано, что все исследуемые соединения имеют специфичность в отношении АТ-пар нуклеотидов ДНК. Димерные бисбензимидазолы серии $DB_2P(n)$ и $DB_2(n)$ обладают повышенным сродством к последовательностям (AATT)₃ и TTTT. Для $DB_2Py(n)$ определена высокая специфичность к АТ-богатым последовательностям и склонность первоочередно связываться с TTTT-мотивом. Все исследованные соединения не взаимодействуют с последовательностями, содержащими менее четырех АТ-пар оснований. Результаты демонстрируют потенциал этих соединений как инструментов для воздействия на определенные последовательности ДНК, что открывает перспективы их применению в молекулярной биологии и разработке лекарственных препаратов.

Ключевые слова: сиквенс-специфичные узкобороздочные лиганды, бисбензимидазолы, футпринтинг, флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК

DOI: 10.31857/S0132342325030048, **EDN:** KQCIMC

Сокращения: Сокращения: $DB_2(n)$ – MB_2 , димеризованный нормальными α,ω -дикарбоновыми кислотами по азоту аминометиленовой группы, где n – количество метиленовых звеньев в линкере; $DB_2P(n)$ – MB_2 , димеризованный 1,4-пиперазиндиалкилкарбоновой кислотой по азоту аминометиленовой группы, где n – количество метиленовых звеньев в половине линкера; $DB_2Py(n)$ – MB_2Py , димеризованный нормальными α,ω -дикарбоновыми кислотами по аминогруппе в третьем положении пиррольного цикла, где n – количество метиленовых звеньев в линкере; FAM – флуоресцеин; HT – Hoechst 33342; MB_2 – {6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-1,3-бензодиазол-2-ил]-1H-1,3-бензодиазол-2-ил}метанамин; MB_2Py – 5-{6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-1,3-бензодиазол-2-ил]-1H-1,3-бензодиазол-2-ил}-1-пропил-1H-пиррол-3-амин; TAMRA – карбокситетраметилродамин.

Автор для связи: (эл. почта: susovaolga@gmail.com).

ВВЕДЕНИЕ

Производные бензимидазола обладают широким спектром биологической активности: противоопухолевыми, противовирусными, противогрибковыми, антибактериальными, антигельминтными, анти-ВИЧ-1 репликационной активностью [1–5]. Низкомолекулярные ДНК-лиганды на основе бисбензимидазольного мотива характеризуются нековалентным связыванием с двухцепочечной ДНК и селективностью к АТ-богатым последовательностям [6]. Однако из литературы известно, что различные производные бисбензимидазола могут отличаться склонностью к связыванию с определенными АТ-богатыми последовательностями. Было установлено, что из всех А/Т-триплетов Hoechst 33258 обладает максимальным сродством к последовательности (5')-AA(A/T), а в случае А/Т-тетраплетов – к последовательности (5')-AATT [7]. Данный аспект весьма важен для понимания механизма действия и уровня биологической активности низкомолекулярных узкобороздочных лигандов. В настоящей работе было изучено сродство к АТ-богатым последовательностям различного нуклеотидного состава трех серий димерных ДНК-лигандов на основе бисбензимидазольного мотива, полученных нами ранее и обладающих отличной друг от друга биологичес-

кой активностью – $DB_2(n)$, $DB_2P(n)$ и $DB_2Py(n)$ (рис. 1).

Hoechst 33342 (НТ), один из наиболее изученных ДНК-лигандов содержащий бисбензимидазольный мотив, нековалентно связывается с В-формой ДНК по узкой бороздке, предпочтительно взаимодействуя с кластерами из трех-четырех АТ-пар со стехиометрией одна молекула лиганда на один сайт связывания и накрывает при этом полвитка двойной спирали ДНК [8]. С целью увеличения размера сайта связывания и константы комплексобразования молекулы с ДНК нашей группой были синтезированы димерные производные НТ [9]. Вследствие низкой растворимости димеров НТ в водных растворах приходилось использовать в биохимических исследованиях их рабочие растворы на основе DMSO. Для улучшения растворимости была смоделирована и синтезирована серия димерных бисбензимидазолов $DB_2(n)$ на основе мономерного бисбензимидазола MB_2 [10]. Соединение MB_2 было получено в качестве водорастворимого аналога НТ за счет удаления из его структуры гидрофобного этоксифенильного фрагмента и введения на его место гидрофильной аминотетильной группы (рис. 1). Две молекулы MB_2 соединены олигометиленовым линкером различной длины с обра-

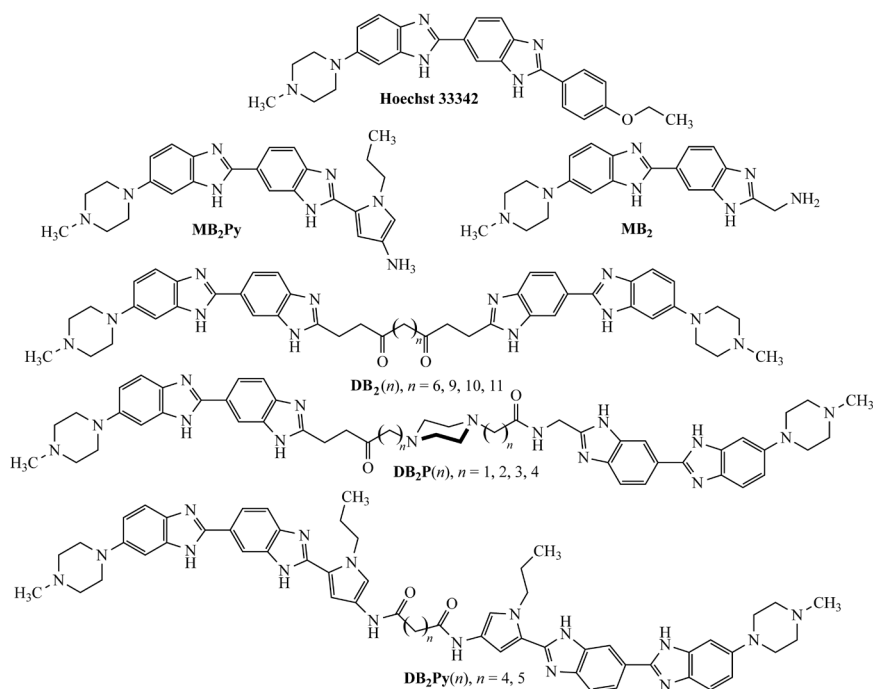


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых узкобороздочных лигандов.

зованием молекулы $DB_2(n)$. Для дальнейшего повышения растворимости $DB_2(n)$ в водных растворах в олигометиленовый линкер молекул дополнительно ввели остаток 1,4-пиперазина (введены 1,4-пиперазинаовые фрагменты), что привело к повышению положительного заряда молекулы и увеличению ее сродства к ДНК. Эта серия соединений, обозначаемая в дальнейшем как $DB_2P(n)$, была хорошо растворима в водных растворах (до концентрации 10 мМ и выше) и обладала низкой цитотоксичностью [11]. Следующим этапом стало получение ДНК-лигандов серии $DB_2Py(n)$ – димерные молекулы мономерного соединения MB_2Py , также являющегося производным НТ, в котором этоксибензильный фрагмент заменен АТ-распознающим пирролкарбоксамидным блоком антибиотика нетропсина. Данные структуры – производные бисбензимидазола, однако они способны образовывать каждым мономерным звеном три водородные связи с АТ-парами. Пирролкарбоксамидный фрагмент – структурная единица антибиотиков нетропсина и дистамицина, обладающих более высокой цитотоксичностью по сравнению с НТ [12]. Показано, что соединения $DB_2Py(n)$ имеют значительно более высокую цитотоксичность по отношению к клеточным линиям человека по сравнению с димерными лигандами $DB_2(n)$ и $DB_2P(n)$ [13], что делает их весьма перспективными кандидатами для создания на их основе сайт-специфичных противоопухолевых препаратов.

Целью настоящей работы было определение сиквенс-специфичности новых димерных бисбензимидазолов $DB_2(n)$, $DB_2P(n)$ и $DB_2Py(n)$ методом футпринтинга с ДНКазой I на АТ-богатых сайтах различного нуклеотидного состава.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные исследования подтверждают, что ДНК – основная мишень в клетке для бисбензимидазолов, которые преимущественно связываются с АТ-парами. К методам изучения взаимодействий ДНК-связывающих молекул с ДНК относится футпринтинг с ДНКазой I. Метод наиболее простой и доступный, позволяет получать данные о структуре комплексов веществ с ДНК. Узкобороздочный лиганд, связываясь со специфической последовательностью ДНК-дуплекса, защищает ДНК от разрезающего агента (ДНКазы I), в то время как свободные участки ДНК

подвергаются разрезанию. Участок связывания лиганда определяют по последовательности, не подвергнувшейся расщеплению. Продукты расщепления визуализируются в виде лестницы в ходе электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Уменьшение интенсивности полос или вовсе их исчезновение говорит о связывании молекулы с ДНК. Оптимизированный нами метод футпринтинга [14] был применен для изучения свойств трех серий димерных бисбензимидазолов $DB_2P(n)$, $DB_2(n)$ и $DB_2Py(n)$ – ДНК-специфичных соединений, для которых ранее не была исследована специфичность к определенным последовательностям ДНК.

Профили расщепления дуплекса ДНК с мономерными и димерными бисбензимидазолами различаются. Первоначально мы сравнили профили расщепления димерных соединений серий $DB_2(n)$ и $DB_2P(n)$ с профилями расщепления мономерного MB_2 и НТ, специфичность которых хорошо изучена (рис. 2). При сравнении профилей расщепления ДНК НТ и MB_2 в концентрации 5 мкМ наблюдается высокое сродство НТ ко всем

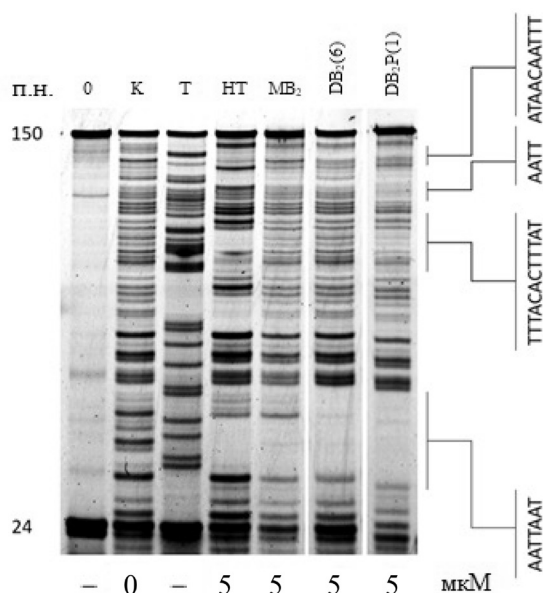


Рис. 2. Профили расщепления ДНКазой I флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов d150T в присутствии мономерных и димерных бисбензимидазолов. 0 – исходный 150-звенный ПЦР фрагмент; К – расщепление ДНКазой I в отсутствие узкобороздочных лигандов; Т – химическое расщепление по тиминам; НТ – расщепление в присутствии НТ, MB_2 – расщепление в присутствии MB_2 , $DB_2(6)$ – расщепление в присутствии $DB_2(6)$, $DB_2P(1)$ – расщепление в присутствии $DB_2P(1)$.

АТ-богатым последовательностям, в то время как MB_2 проявляет ярко выраженную селективность к связыванию с сайтом ААТТААТ. Обе исследованные серии димерных бисбензимидазолов, в которых фрагменты MB_2 соединены олигометиленовым для $DB_2(n)$ или олигометилен-пиперазиновым для $DB_2P(n)$ линкерами (рис. 1), показали схожую картину ингибирования рестрикции ДНК. При сравнении $DB_2(6)$ и $DB_2P(1)$, имеющих, согласно расчетным значениям, схожую длину линкера, наблюдается активное связывание в области ААТТААТ, аналогичное мономерному соединению, однако для димерных производных ввиду их большего стерического размера также происходит закрывание соседней GTGATT-области. Данное явление, по всей видимости, связано с высоким сродством мономерной субъединицы к ААТТААТ-повтору и взаимодействию второй субъединицы димера с TGATT-мотивом, не являющимся оптимальным сайтом для связывания (рис. 2). Различие в профиле расщепления ДНК между $DB_2P(1)$ и $DB_2(6)$ – меньшая селективность связывания для $DB_2P(1)$, по всей видимости, обусловленная повышенным сродством к отрицательно заряженной ДНК ввиду большего положительного заряда на молекуле лиганда. Так, для $DB_2P(1)$ наблюдается связывание в области других АТ-богатых сайтов – ААТТ и АСТТТАТ (рис. 2).

Профили расщепления дуплекса ДНК с димерами серий $DB_2P(n)$ и $DB_2(n)$ аналогичны. При сравнении профилей расщепления дуплекса d150T в присутствии нескольких гомологов серии $DB_2P(n)$ наблюдалась картина, аналогичная для вышеописанного $DB_2P(1)$ (рис. 3). Все четыре полученных и исследованных нами представителя данной серии проявили высокую селективность к последовательности ААТТААТGTGAG. Из картины профилей расщепления ДНКазой I 150-звенного ДНК-дуплекса в присутствии гомологов $DB_2(n)$ (рис. 4) можно сделать вывод, что специфичность $DB_2(n)$ к ДНК аналогична АТ-специфичности $DB_2P(n)$, однако слабее выраженное уменьшение интенсивности полос расщепления говорит о существенно меньшей константе связывания по сравнению с $DB_2P(n)$. Так, для $DB_2P(1)$ наблюдается заметное ингибирование рестрикции сайта ААТТААТGTGAG уже при концентрации 2.5 мкМ, в то время как для $DB_2(6)$ данный эффект достигается при вдвое большей концентрации.

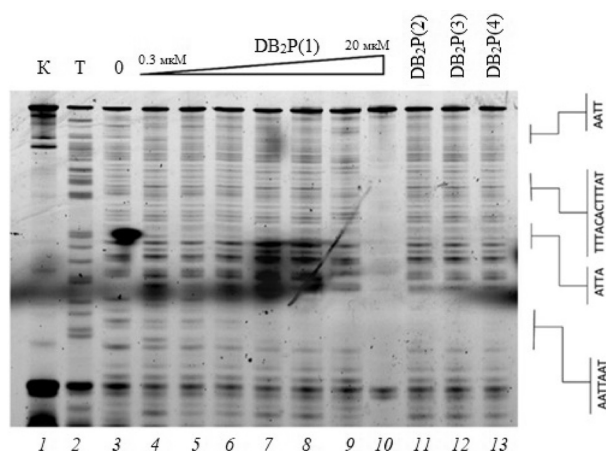


Рис. 3. Профили расщепления ДНКазой I флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов d150T в присутствии соединений серии $DB_2P(n)$. 1 (К) – исходный 150-звенный ПЦР фрагмент; 2 (Т) – химическое расщепление по тиминам; 3 (0) – расщепление ДНКазой I в отсутствие узкобороздочных лигандов; 4–10 – расщепление в присутствии $DB_2P(1)$, взятого в концентрациях 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 и 20 мкМ соответственно; 11 – расщепление в присутствии 5 мкМ $DB_2P(2)$; 12 – расщепление в присутствии 5 мкМ $DB_2P(3)$; 13 – расщепление в присутствии 5 мкМ $DB_2P(4)$.

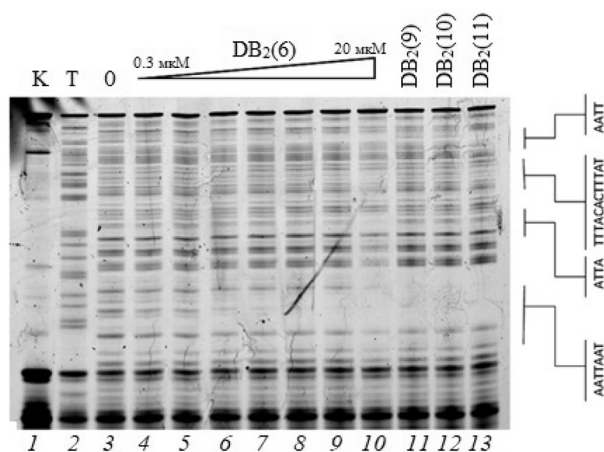


Рис. 4. Профили расщепления ДНКазой I флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов d150T в присутствии соединений серии $DB_2(n)$. 1 (К) – исходный 150-звенный ПЦР фрагмент; 2 (Т) – химическое расщепление по тиминам; 3 (0) – расщепление ДНКазой I в отсутствие узкобороздочных лигандов; 4–10 – расщепление в присутствии $DB_2(6)$, взятого в концентрациях 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 и 20 мкМ соответственно; 11 – расщепление в присутствии 5 мкМ $DB_2(9)$; 12 – расщепление в присутствии 5 мкМ $DB_2(10)$; 13 – расщепление в присутствии 5 мкМ $DB_2(11)$.

Известно, что АТ-богатые последовательности обладают отличными от канонической В-формы ДНК параметрами, такими как асимметрия малой бороздки ДНК и искривление двойной спирали ДНК [15]. Для более детального изучения АТ-специфичности узкобороздочных лигандов был синтезирован ДНК-дуплекс d84AT, состоящий из АТ-пар в различных комбинациях (табл. 1). Данный ДНК-дуплекс содержал в себе повторы АТ и ААТТ и массив из АТ-пар длиной 4–7 нт. Такой перебор вариантов АТ позволяет выбрать последовательность, где образование АТ-специфичных водородных связей соединений с ДНК наиболее благоприятно, и, следовательно, специфичность соединений должна быть наиболее высокой.

При анализе профиля расщепления DB₂P(1) в различных концентрациях на дуплексе d84AT было обнаружено, что при концентрации 2 мкМ исследуемый лиганд частично защищает от рестрикции (ААТТ)₃-фрагмент дуплекса. Это согласуется с полученными на дуплексе d150T результатами. Однако в данном эксперименте было выявлено при тех же условиях практически полное экранирование ТТТТ-мотива, что говорит о еще большем сродстве к данной последовательности (рис. 5).

MB₂, DB₂(n), DB₂P(n) и DB₂Py(n) не связываются с GC-богатыми последовательностями. В то же время все протестированные лиганды не проявляли сродства к ДНК, не содержащей АТ-пар. На рис. 6 приведен пример футпринтинга

Таблица 1. Специфичные АТ-богатые последовательности для связывания мономерными и димерными бисбензимидазолами

Название	Последовательность (5'→3')
Hoechst 33342	ААТТААТ, АСТТТАТ, ААТТ, АТААСААТТТ
DB ₂ (n)	ТТТТ, ААТТААТ
MB ₂	ТТТТ, ААТТААТГТГАГ
DB ₂ P(n)	ТТТТ, ААТТААТГТГАГ
DB ₂ Py(n)	ТТТТ, ТАТАТААГСАГА, ТТТАГТГААС, ТСАГАТС, ГТТТТГАС, АТАГААГАС

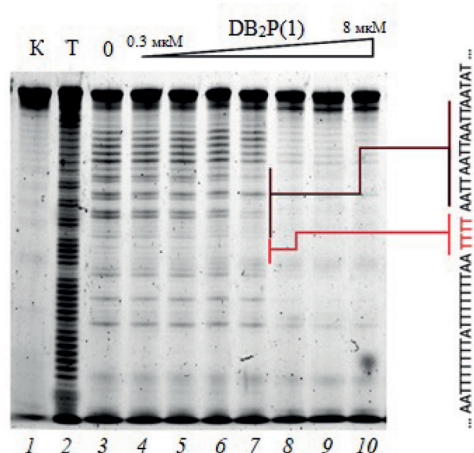


Рис. 5. Профили расщепления ДНКазой I TAMRA-меченых ПЦР-фрагментов d84AT в присутствии DB₂P(1). 1 – исходный 84-звенный ПЦР фрагмент; 2 – химическое расщепление по тиминам; 3 – расщепление ДНКазой I в отсутствие DB₂P(1); 4–10 – расщепление в присутствии DB₂P(1), взятого в концентрациях 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 6 и 8 мкМ соответственно.

дуплекса ДНК d87KNS в присутствии DB₂P(1). Данный дуплекс не содержит последовательностей, содержащих более одной АТ-пары оснований (за исключением короткой последовательности на конце дуплекса, гидролиз которой на электрофореze не визуализируется). Снижение гидролиза ДНК не наблюдается даже при высоких концентрациях соединений серии DB₂P(*n*), что говорит об отсутствии взаимодействия с ДНК, не содержащей подряд двух АТ-пар. Аналогичная картина наблюдается и для других исследованных соединений.

Бисбензимидазолпирролы способны связываться с участками ДНК, содержащими включения GC-пар. Следующим этапом работы стало определение сиквенс-специфичности димерных бисбензимидазолпирролов, что представлялось одним из подходов к установлению механизма их высокой токсичности.

Метод футпринтинга позволил определить специфичность DB₂Py(4) и DB₂Py(5) к нуклеотидной последовательности. Для этого был использован полноразмерный промотор trCMV [16]. Одна

из нитей ДНК, содержащей 144 п.н., была мечена FAM на 5'-конце с использованием соответствующего праймера при амплификации ДНК-фрагмента. Данный ДНК-дуплекс был выбран ввиду наличия всех потенциально интересных АТ-богатых мотивов, а также наличия смешанных нуклеотидных последовательностей, содержащих различное количество GC-пар. Поскольку соединения DB₂Py(*n*) отличаются большей денатантностью, было интересно исследовать их способность связываться с подобными последовательностями.

Результаты показали, что при концентрации 15 мкМ соединения DB₂Py(4) и DB₂Py(5) эффективно защищали ДНК от расщепления ДНКазой I (рис. 7). Были выявлены основные сайты связывания лигандов на данном дуплексе. Как и предполагалось, все защищенные от расщепле-

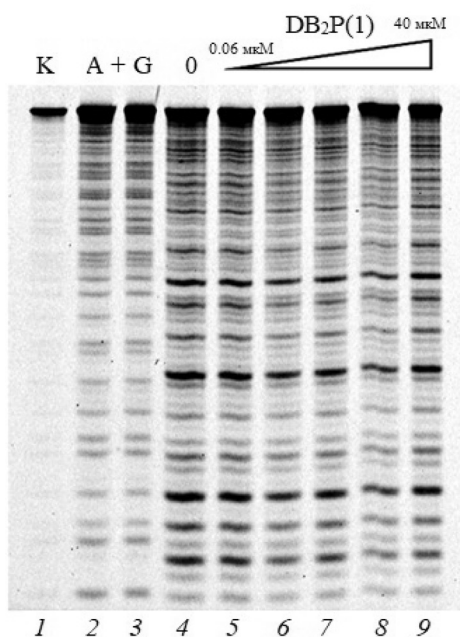


Рис. 6. Профили расщепления ДНКазой I FAM-меченых ПЦР-фрагментов d87KNS в присутствии соединения DB₂P(1). 1 – исходный 84-звенный ПЦР фрагмент; 2, 3 – химическое расщепление по аденинам и гуанинам в присутствии муравьиной кислоты; 4 – расщепление ДНКазой I в отсутствие узкобороздочных лигандов; 5–9 – расщепление в присутствии DB₂P(1), взятого в концентрациях 0.06, 0.3, 1.6, 8 и 40 мкМ соответственно.

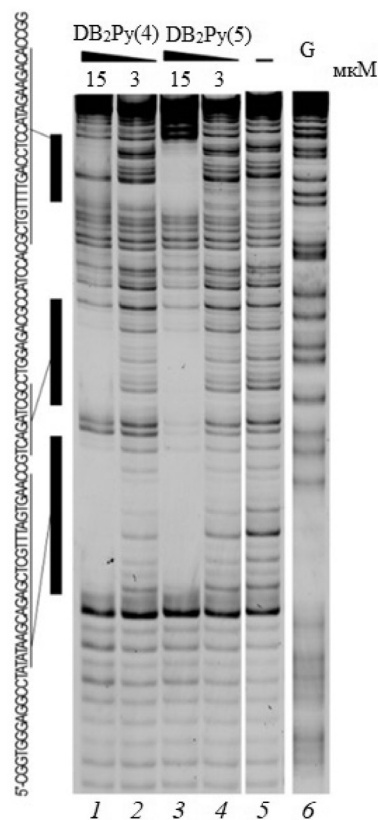


Рис. 7. Селективность соединений DB₂Py(4) и DB₂Py(5) к нуклеотидной последовательности. На гелях показаны результаты футпринтинга с ДНКазой I для фрагмента промотора trCMV, меченного FAM на 5'-конце, в присутствии соединений DB₂Py(4) и DB₂Py(5). Указана концентрация 3 и 15 мкМ, контроль без лигандов – дорожка (–). Дорожка G представляет разрезы исследованной последовательности по гуанинам, полученные с использованием диметилсульфата.

ния участки содержали АТ-богатые последовательности, что подтверждает высокую специфичность данных лигандов к таким регионам. Интересно что, при данной концентрации исследуемые соединения практически полностью ингибировали рестрикцию ДНК на сайте TCAGATC, не содержащем подряд более одной АТ-пары. Это показывает высокое сродство DB₂Py(*n*) даже к участкам ДНК, содержащим до 42% GC-пар, и может косвенно объяснять высокую токсичность данных соединений ввиду большей численности потенциальных сайтов связывания. При общем анализе были определены следующие сайты связывания (выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты): 5'-CGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCT**TATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCTGGTACCATG**-3' (рис. 6).

При сравнении профиля расщепления при концентрации 15 и 3 мкМ DB₂Py(4) наблюдается значительно более слабое ингибирование ДНКазы I при меньшей концентрации, и проявляется наибольшая склонность связываться с TATATAA-мотивом. Однако для соединения DB₂Py(4) так же ярко выражено связывание с последовательностью **GTTTTG**, возможно обусловленное связыванием с данным сайтом только одной мономерной субъединицы димера. Для соединения DB₂Py(5) данная картина выражена слабее.

По результатам исследования были определены специфичные последовательности ДНК для связывания мономерными, димерными бисбензимидазолами и бисбензимидазол-пирролами (табл. 2).

Таким образом, в работе были исследованы три серии димерных бисбензимидазолов на специфичность их связывания с определенными последовательностями ДНК. Все исследованные димерные бисбензимидазолы – DB₂(*n*), DB₂P(*n*) и DB₂Py(*n*) – проявляют склонность к связыванию с АТ-богатыми участками ДНК, подтверждая их высокую сиквенс-специфичность.

Методом футпринтинга нам удалось определить наибольшее сродство серии DB₂P(*n*) к последовательности TTTT-тетраплета. DB₂P(*n*) демонстрирует более сильное ингибирование рестрикции ДНКазой I даже при низких концентрациях (2–3 мкМ), тогда как DB₂(*n*) требует вдвое больших концентраций для достижения аналогичного эффекта.

Из литературных данных известно, что Hoeschst 33258 закрывает только один АТ-богатый тетраплет [7]. Новые производные НТ, содержащие два бисбензимидазольных блока, при взаимодействии с ДНК закрывают три последовательности ААТТ, т.е. путем димеризации молекулы нам удалось усилить сайт-специфичность и увеличить размер закрываемого фрагмента ДНК. Соединения двух исследованных серий димерных бисбензимидазолов различаются структурой линкера между двумя сим-

Таблица 2. ДНК-дууплексы, использованные в работе

Название*	Последовательность (5'→3')
D150T	(TAMRA)ATATTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGT-TAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT-GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
D84AT	(TAMRA)TAGCACTGCTCAGTGCCGAAAAAATTTTTTTATTTTTTTAATTTTTAATTAATT-AATTAATATATATATATATATCGTCAGCCTA
D87KNS	TTTtagtcacgactgtcacacctgacgagtcacaggtcacccggtctggacgtgtcact-gactaccatggtcatactgctgtttcccca(FAM)
CMVwt144	(FAM)CGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAC-CGATCCAGCCTCCTGGTACCATG

* Цифра в названии ДНК-дууплекса означает его длину (п.н.).

метричными бисбензимидазольными блоками. Введение пиперазина в линкер серии DB₂P(*n*) привело к повышению сродства к ДНК. Для соединений DB₂Py(4) и DB₂Py(5) показана возможность связываться с АТ-содержащими сайтами, не имеющими более одного АТ-повтора подряд, а также определена склонность данных соединений к взаимодействию с чередующимися повторами АТАТ и ТТТТ аналогично сериям, не содержащим пирролкарбоксамидный мотив. Это может объяснять высокую токсичность данных соединений, т.к. они могут воздействовать на широкий диапазон последовательностей. Соединения DB₂Py(*n*) обладают большей денатностью, что позволяет им связываться даже с последовательностями, содержащими менее АТ-богатые участки (например, ТСАГАТС), а также с чередующимися АТ-повторами. Все исследованные соединения не связываются с GC-богатыми последовательностями. Это подчеркивает их специфичность и механизм действия, зависящий от структуры малой бороздки в АТ-богатых регионах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Hoechst 33342 – 2'-(4-этоксифенил)-5-(4-метил-1-пиперазинил)-2,5'-бис-бензимидазола тригидрохлорид, Hoechst 33258 – 2'-(4-гидроксифенил)-5-(4-метил-1-пиперазинил)-2,5'-бис-бензимидазолтригидрохлоридгидрат (Sigma, США). Узкобороздочные лиганды DB₂Py(*n*), DB₂(*n*), DB₂P(*n*) и MB₂ были синтезированы в лаборатории ДНК-белковых взаимодействий ФГБУН ИМБ РАН. В качестве растворителей использовали DMSO (ПанЭко, Россия) и воду, очищенную системой milli-Q (Milli-Q Advantage A10, Millipore, США).

Получение флуоресцентно-меченых ДНК-дуплексов. Флуоресцентно-меченые (TAMRA, FAM) фрагменты ДНК d84AT и d87KNS получали смешиванием соответствующих олигонуклеотидов с последующей ренатурацией (нагреванием до 95°C и медленным охлаждением до комнатной температуры).

Флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК d150T и trCMV получали методом ПЦР-амплификации. Для фрагмента d150T в качестве матрицы использовали плазмиду pUC19 (участок последовательности 475–617) и праймеры: CTCTAGTGT-CGACCTGCAGGCATG/(TAMRA)ATATT-

TTCCCGACTGGAAAGCGGG. Фрагменты (144 п.н.) промоторной ДНК trCMV амплифицировали с соответствующего вектора [16]. Пары праймеров FAM-cmvF/cmvR 5'-FAM-GATATAC-GCGTTCGAGGTA/GTACCAGGAGGCTGGAT-3' использовали для получения дуплекса ДНК с одной нитью, меченной с 5'-конца. ПЦР осуществляли стандартных условиях.

Футпринтинг. Комплексообразование лигандов с ДНК проводили в течение 15 мин при 37°C в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: буфер А (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂), флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК (0.2 мкМ) и узкобороздочные лиганды в различных концентрациях. Затем добавляли 3 мкл 0.5 ЕА/мкл ДНКазы I (оптимальную концентрацию фермента подбирали в предварительных экспериментах), инкубировали 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл формамида и нагреванием до 95°C в течение 5 мин. Комплексы DB₂Py(4) (3 или 15 мкМ) или DB₂Py(5) (3 или 15 мкМ) с FAM-мечеными фрагментами ДНК CMVwt (по 500 нМ) преинкубировали в буфере для связывания, содержащем 20 mM KCl, дополненном 2 mM MgCl₂, при 37°C в течение 15 мин, а затем рестрицировали в течение 2 мин с 0.03 ед. ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США).

Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в денатурирующем 10%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, и визуализировали на флуоресцентном сканере Typhoon FLA (General Electric, США). Полосы для секвенирования гуанина получали путем инкубации фрагментов ДНК в 2%-ном диметилсульфате при комнатной температуре в течение 3 мин с последующим осаждением этанолом и инкубацией (30 мин, 95°C) в загрузочном буфере (90%-ный формамид, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный цианолксилон). Реакции останавливали добавлением этанола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена сайт-специфичность трех серий ДНК-лигандов на основе бисбензимидазольного мотива, исследовано влияние как линкера, так и мономерного блока на сиквенс-специфичность полученных лигандов. Для всех исследуемых соединений определены предпочтительные сайты

связывания на АТ-богатых мотивах различного нуклеотидного состава.

DB₂P(*n*) и DB₂Py(*n*) показали высокую специфичность и большую аффинность к АТ-богатым последовательностям ДНК по сравнению с мономерными аналогами (Hoechst). Это подтверждает тот факт, что димеризация и модификация линкера улучшают функциональные свойства молекулы.

Для соединений DB₂Py(4) и DB₂Py(5), выступающих гексадентатными лигандами показана возможность связываться с участками дцДНК не содержащими более одной АТ пары подряд.

Установленные различия между сериями соединений позволяют целенаправленно модифицировать их структуру для повышения специфичности или токсичности. Димерные бисбензимидазолы могут быть использованы для создания препаратов с высокой селективностью к определенным участкам ДНК, что открывает перспективы их применения в биомедицине, например, для разработки высокоточных противоопухолевых агентов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00373.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы ДСН и АФА внесли равный вклад в исследование.

Концептуализация – АФА, ОЮС; экспериментальные работы – ДСН, АДБ, НМС; написание статьи – АФА, ОЮС; анализ данных – АФА, ДНК; администрирование проекта – АЛЖ, ОЮС.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu K., Peng X., Chen M., Li Y., Tang G., Peng J., Peng Y., Cao X. // Chem. Biol. Drug. Des. 2022. V. 99. P. 736–757.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.14022>
2. Tyagi Y.K., Jali G., Singh R. // Med. Chem. 2022. V. 22. P. 3280–3290.
<https://doi.org/10.2174/1871520622666220429134818>
3. Alniss H.Y., Al-Jubeh H.M., Msallam Y.A., Siddiqui R., Makhlof Z., Ravi A., Hamdy R., Soliman S.S.M., Khan N.A. // Eur. J. Med. Chem. 2024. V. 271. P. 116440.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116440>
4. Pan T., He X., Chen B., Chen H., Geng G., Luo H., Zhang H., Bai C. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 5. P. 500–513.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.050>
5. Phan N.K., Huynh T.K., Nguyen H.P., Le Q.T., Nguyen T.C., Ngo K.K., Nguyen T.H., Ton K.A., Thai K.M., Hoang T.K. // ACS Omega. 2023. V. 28. P. 28733–28748.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03530>
6. Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 25. P. 2671–2690.
<https://doi.org/10.1093/nar/16.6.2671>
7. Breusegem S.Y., Clegg R.M., Loontjens F.G. // J. Mol. Biol. 2002. V. 1. P. 1049–1061.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5301>
8. Bazhulina N.P., Nikitin A.M., Rodin S.A., Surovaya A.N., Kravatsky Y.V., Pismensky V.F., Archipova V.S., Martin R., Gursky G.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2009. V. 26. P. 701–718.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2009.10507283>
9. Streltsov S.A., Gromyko A.V., Oleinikov V.A., Zhuze A.L. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2006. V. 24. P. 285–302.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2006.10507121>
10. Ivanov A.A., Salianov V.I., Strel'tsov S.A., Cherepanova N.A., Gromova E.S., Zhuze A.L. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 530–541.
<https://doi.org/10.1134/s1068162011040054>
11. Ivanov A.A., Koval V.S., Susova O.Y., Salyanov V.I., Oleinikov V.A., Stomakhin A.A., Shalginskikh N.A., Kvasha M.A., Kirsanova O.V., Gromova E.S., Zhuze A.L. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. V. 1. P. 2634–2638.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.04.087>
12. Neidle S. // Nat. Prod. Rep. 2001. V. 18. P. 291–309.
<https://doi.org/10.1039/a705982e>

13. Susova O.Y., Karshieva S.S., Kostyukov A.A., Moiseva N.I., Zaytseva E.A., Kalabina K.V., Zusinaite E., Gildemann K., Smirnov N.M., Arutyunyan A.F., Zhuze A.L. // *Act. Nat.* 2024. V. 16. P. 86–100.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27327>
14. Naberezhnov D.S., Kirsanov K.I., Glazunov V.Y., Belitskiy G.A., Yakubovskaya M.G. // *Russ. Fundam. Res.* 2015. V. 2. P. 5599–5604.
15. Caneva R., De Simoni A., Mayol L., Rossetti L., Savino M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 7. P. 93–97.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(97\)00091-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(97)00091-2)
16. Isagulieva A.K., Kaluzhny D.N., Beniaminov A.D., Soshnikova N.V., Shtil A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 8871.
<https://doi.org/10.3390/ijms23168871>

Sequence Specificity of Dimeric Bisbenzimidazoles to AT-Sequences of DNA of Different Nucleotide Composition Determined by Footprinting

D. S. Naberezhnov*, **, A. F. Arutyunyan*, A. D. Beniaminov*, N. M. Smirnov*,
D. N. Kaluzhny*, A. L. Zhuze*, and O. Y. Susova*, **, #

E-mail: susovaolga@gmail.com

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

** N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health,
Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522 Russia

The study aimed to investigate the site-specificity of binding to DNA of three series of minor groove ligands – dimeric bisbenzimidazoles DB₂(*n*), DB₂P(*n*), and DB₂Py(*n*) – using DNAase I footprinting. The compounds consist of two bisbenzimidazole units linked by oligomethylene linkers of varying lengths (*n*), with structural modifications to enhance DNA-binding properties. The binding specificity of the compounds was determined using DNAase I footprinting. The DB₂(*n*) and DB₂P(*n*) series are analogs of Hoechst 33342, modified by removing hydrophobic ethoxyphenol cores and introducing hydrophilic aminomethylene groups. The DB₂Py(*n*) series incorporates a pyrrolcarboxamide group, a structural unit of the AT-specific antibiotic netropsin. The interaction of these compounds with DNA sequences was analyzed to identify their binding preferences. All studied compounds demonstrated specificity for AT-rich DNA sequences. The DB₂P(*n*) and DB₂(*n*) series exhibited increased affinity for (AATT)₃ and TTTT sequences. The DB₂Py(*n*) series showed high specificity to AT-rich regions, with a preference for the TTTT motif. None of the compounds interacted with sequences containing fewer than four AT base pairs. These findings highlight the influence of structural modifications on DNA-binding specificity and affinity. The study revealed that dimeric bisbenzimidazoles DB₂(*n*), DB₂P(*n*), and DB₂Py(*n*) exhibit distinct binding preferences for AT-rich DNA sequences, with DB₂Py(*n*) showing a pronounced affinity for the TTTT motif. The results demonstrate the potential of these compounds as tools for targeting specific DNA sequences, with implications for molecular biology and drug design.

Keywords: sequence-specific minor groove ligands, bisbenzimidazoles, footprinting, fluorescently labeled DNA fragments