

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ  
ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ՖԱԿՈՒԼՏԵՏ  
ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱՅԻ ԱՄԲԻՈՆ

ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ ԼԻԼԻԹ ԱՐՄԵՆԻ

ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ՄԵԹԻԼԵՆ ԿԱՊՈՒՅՏԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅՈՒՆ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի համար

Գիտական ղեկավար,  
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,  
պրոֆեսոր՝ Պ.Հ. Վարդևանյան

ԵՐԵՎԱՆ 2015

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ.....4

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ .....8

1.1. ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման մեխանիզմները .....8

1.1.1. Ինտերկալյացիայի մեխանիզմը .....8

1.1.2. ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում լիզանդների կապման մեխանիզմը .....15

1.2. ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և ՄԿ-ի կապման առանձնահատկությունները ... .. 23

1.3. Պարույր-կծիկ փոխարկումը ԴՆԹ-ում .....31

1.3.1. ԴՆԹ-ում պարույր-կծիկ անցման թերմոդինամիկան .....33

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ .....40

2.1. Օգտագործված նյութեր և սարքեր .....40

2.2. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսների պատրաստումը .....40

2.3. Կապման կորերի կառուցումը Սկետչարդի կոորդինատներով .....41

2.4. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապված մոլեկուլների  
քանակական որոշման ֆլյուորեսցենտային մեթոդը .....42

2.5. ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների որոշման ֆլյուորիմետրիկ մեթոդը .....43

2.6. ԴՆԹ-ի և ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման  
ուսումնասիրությունը հալման մեթոդով .....44

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ.....46

3.1. LabView միջավայրում մշակված ծրագրային ապահովում  
սպեկտրոֆոտոմետրիկ հետազոտությունների համար ..... 46

3.2. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունը ..... 56

3.3. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսագոյացման թերմոդինամիկ  
հետազոտությունները .....69

3.4. ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման առանձնահատկությունների  
ուսումնասիրությունը՝ կախված նուկլեոտիդային հաջորդականությունից ...78

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆ .....	97
ԵԶՐԱՀԱՆԳՈՒՄՆԵՐ .....	101
ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ .....	102

**Խնդրի արդիականությունը.** Մոլեկուլային կենսաֆիզիկայի արդիական հարցերից մեկը ներկայումս շարունակում է մնալ ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման մեխանիզմների պարզաբանումը: Գործառնության ընթացքում ԴՆԹ-ն անօրգանական և օրգանական միացությունների հետ ձևավորում է տարբեր տիպի կոմպլեքսներ: Հարկ է նշել, որ ԴՆԹ-ի կենսաբանական ֆունկցիաների վրա կարող են ներազդել ոչ միայն ներբջջային, այլև արտաբջջային բջիջ ներթափանցած միացությունները, որոնց թվում նաև դեղանյութերը:

Այդ տեսանկյունից, ԴՆԹ-ի հետ ցածրամոլեկուլային միացությունների՝ լիզանդների փոխազդեցության ուսումնասիրությունները կարևոր են և հանդիսանում են հիմնարար և կիրառական գիտությունների գլխավոր հարցերից մեկը, քանի որ այդ հետազոտությունները միտված են ոչ միայն ԴՆԹ-ի գործառնության հիմքում ընկած գործընթացների մոլեկուլային մեխանիզմների պարզաբանմանը, այլև նոր, ավելի անվնաս և արդյունավետ դեղամիջոցների սինթեզին [1,2].

ԴՆԹ-ի հետ անմիջականորեն կապվող լիզանդների թվում առանձնակի հետաքրքրություն են ներկայացնում ինտերկալատորները, որոնցից է նաև ակրիդինային ներկանյութ մեթիլեն կապույտը (ՄԿ): Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ՄԿ-ի հատուկ մշակված ածանցյալները կիրառվում են որպես ԴՆԹ-կենսասենսորներ, օրինակ՝ որպես գործիքներ՝ ԴՆԹ-ում սայտ-ուղղորդված կտրվածքներ առաջացնելու համար:

Այդ լիզանդը ֆոտոզայտուն միացություն է և լայնորեն կիրառվում է բժշկության մեջ, հատկապես ֆոտոդինամիկ թերապիայում (ՖԴԹ): Դա պայմանավորված է նրանով, որ ՄԿ-ը կապվում է սպիտակուցների և նուկլեինաթթուների, ինչպես նաև լիպիդների հետ, կլանելով լույսի քվանտի էներգիան՝ անցնում է ֆոտոակտիվ վիճակի: Այնուհետև, ՄԿ-ի ֆոտոակտիվացված մոլեկուլները թթվածնի մոլեկուլներին են փոխանցում ակտիվացման էներգիան, որի հետևանքով թթվածինն անցնում է սինգլետային ակտիվացված վիճակի, փոխազդելով կենսամակրոմոլեկուլների հետ առաջացնում է վնասվածքներ դրանց առաջնային կառուցվածքում [3]: Այս հատկության հիման վրա ՄԿ-ը կիրառվում է մի շարք հիվանդությունների, մասնավորապես, մալարիայի,

տարբեր ուռուցքների բուժման ժամանակ: Հայտնաբերվել է նաև, որ ՄԿ-ը մարդու արյան պլազմայում կարող է ճնշել ՄԻԱՎ-ի, հեպատիտ B-ի և C-ի վիրուսները: Վերջին տարիներին այս լիզանդը կիրառվում է նաև որպես կենսասենսոր և ակտիվ օքսիդավերականգնիչ միացություն՝ ԴՆԹ-ում վնասվածքները հայտնաբերելու համար [4]:

Այնուամենայնիվ, չնայած մեծ թվով հետազոտություններին, ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման մեխանիզմները լիարժեք պարզաբանված չեն և մեծ թվով հարցեր դեռևս քննարկման առարկա են և ենթակա են լրացուցիչ հետազոտության:

**Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները.** Ատենախոսական աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման մեխանիզմների ուսումնասիրությունը: Այն իրականացնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- PVEUcam-SP8-100 սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով ստացվող սվյալների ճշգրտության մեծացումը՝ LabVIEW միջավայրում ծրագրային ապահովման միջոցով;
- սպեկտրասկոպիկ (կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրասկոպիաների) մեթոդով ուսումնասիրել ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցությունը՝ լիզանդի կոնցենտրացիայից կախված;
- ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման հաստատունի՝ K-ի և լիզանդի կապված մեկ մոլեկուլին համապատասխանող հիմքերի թվի՝ n-ի որոշումը;
- ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակների բացահայտումը լուծույթի տարբեր իոնական ուժերում;
- ԴՆԹ-ի տարբեր նուկլեոտիդային պարունակությունների նկատմամբ ՄԿ-ի սպեցիֆիկության բացահայտումը:

**Պաշտպանության առաջադրված հիմնադրույթները.** Պաշտպանության են առաջադրվել հետևյալ հիմնադրույթները.

- ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակների պարզաբանումը՝ դրանց կոնցենտրացիաների հարաբերությունից կախված՝ կոմպլեքսների կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա;
- ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման հաստատունի՝ K-ի և լիզանդի կապված մեկ մոլեկուլին համապատասխանող հիմքերի թվի՝ n-ի արժեքների որոշումը;

- ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների հալման ջերմաստիճանի՝  $T_m$ -ի և հալման միջակայքի լայնության՝  $\Delta T$ -ի արժեքների վրա լուծույթի իոնական ուժի ազդեցությունը;
- ՄԿ-ի կապման առանձնահատկությունները՝ ԴՆԹ-ի հետ նուկլեոտիդային հաջորդականություններից կախված:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական նշանակությունը.** Ատենախոսական աշխատանքում ստացված արդյունքները թույլ են տալիս պարզաբանելու ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման որոշ առանձնահատկություններ՝ լուծույթի տարբեր իոնական ուժերում: Մասնավորապես, ստացված տվյալները վկայում են, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ը կապվում է առնվազն երկու եղանակներով և կայունացնում է ԴՆԹ-ի երկշղթա (եշ) կառուցվածքը: Փորձարարականորեն ստացվել է, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման տվյալ եղանակի դրսևորումը կախված է լիզանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունից՝  $r$ -ից: Այդ հարաբերության փոքր արժեքների դեպքում ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է ուժեղ (ինտերկալյացիոն կամ կիսաինտերկալյացիոն), մինչդեռ  $r$ -ի ավելի մեծ արժեքների դեպքում՝ թույլ (էլեկտրաստատիկ) եղանակով: Ընդ որում հայտնաբերվել է, որ ինտերկալյացիոն կամ կիսաինտերկալյացիոն եղանակի դրսևորումը կախված է լուծույթի իոնական ուժից:

Աշխատանքում ստացված տվյալները արժեքավոր են և կարող են ունենալ կիրառական նշանակություն, քանի որ ի հայտ են բերում ԴՆԹ-ի հետ տարբեր լիզանդների կապման որոշ առանձնահատկություններ՝ կախված վերջիններիս կոնցենտրացիայից, միջակայքի պայմաններից և ԴՆԹ-ի կառուցվածքից: Այդ արդյունքները կարևոր են նաև այն առումով, որ կարող են հիմք հանդիսանալ ԴՆԹ-ի հետ կապվող նոր դեղամիջոցների մշակման և սինթեզի համար:

Աշխատանքում ստացված փորձարարական տվյալները նոր հնարավորություններ են ընձեռում այդ ոլորտում հետագա հետազոտությունների համար: Այդ տվյալները կարող են նաև կիրառվել ԵՊՀ-ի համապատասխան ամբիոնների ուսանողների համար ընթերցվող հատուկ կուրսերում, ինչպես նաև այն գիտական կենտրոններում, որտեղ ուսումնասիրվում են ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների փոխազդեցության առանձնահատկությունները:

**Աշխատանքի փորձաքննությունը.** Ատենախոսության նյութերը զեկուցվել և քննարկվել են ԵՊՀ-ի Կենսաֆիզիկայի ամբիոնի սեմինարներում, ինչպես նաև հետևյալ գիտական

կոնֆերանսներում. International Conference “Current Problems of Chemical Physics” dedicated to the 50<sup>th</sup> anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA, Yerevan, 2012; International Conference “Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior”, Yerevan, 2013; The 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> Conversation, Albany (USA) 2013, 2015.

**Հրատարակված աշխատանքներ.** Ատենախոսության թեմայով հրատարակվել են 12 գիտական աշխատանքներ՝ 8 հոդված և 4 թեզիս:

## ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

### 1.1. ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման մեխանիզմները

Հայտնի է, որ ԴՆԹ-ն բջջում վերահսկում և կարգավորում է գրեթե բոլոր այն գործընթացները, որոնք ունեն կենսական նշանակություն, ընդ որում, նրա գործառնությունների բազմազանությունը որոշվում է կառուցվածքային փոխարկումներով և լիզանդների հետ տարբեր տիպի կոմպլեքսների առաջացմամբ: Ըստ ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության բնույթի՝ միացությունները բաժանվում են երկու խմբի՝ անդարձելի կամ կովալենտ և դարձելի կամ ոչ կովալենտ կապվող նյութեր [5-7]:

Անդարձելի փոխազդեցության դեպքում միացությունները ԴՆԹ-ի հետ առաջացնում են կովալենտ կապեր և հրահրում են ոչ դարձելի փոփոխություններ նրա կառուցվածքում: Կովալենտ կապվող միացությունները հիմնականում պարունակում են մետաղի իոններ [2,5]: Դարձելի փոխազդեցության ժամանակ լիզանդները ԴՆԹ-ի տարբեր գործառնական խմբերի հետ առաջացնում են ոչ կովալենտ (<<թույլ>>) տիպի կապեր, ընդ որում, այդ կապերը արտաքին որոշակի գործոնների ազդեցության ներքո կարող են խզվել: Այնուամենայնիվ, դարձելի կապվող միացությունները՝ լիզանդները կարող են էականորեն ազդել ԴՆԹ-ի ջերմակայունության և կոնֆորմացիոն վիճակի վրա:

Լիզանդները ԴՆԹ-ի հետ կարող են կապվել տարբեր մեխանիզմներով՝ ինտերկալյացիոն (լիզանդի մուլեկուլը ներդրվում է ԴՆԹ-ի հիմքերի զույգերի հարթությունների միջև), ակոսային փոխազդեցությամբ (լիզանդի մուլեկուլը տեղակայվում է ԴՆԹ-ի ակոսներից մեկում), էլեկտրաստատիկ (կատիոնային լիզանդների դեպքում) [5-7]:

#### 1.1.1. Ինտերկալյացիայի մեխանիզմը

ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոն մեխանիզմով կապվող լիզանդները մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում, քանի որ դրանք քիմիական կառուցվածքով նման են ազոտային հիմքերին և կարող են ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդների հետ առաջացնել ոչ կանոնավոր զույգեր, ինչը հանգեցնում է սխալների առաջացմանը նուկլեինաթթուների



կառուցվածքում: Այս մեխանիզմով են առաջանում կետային մուտացիաները գենոմում, որը հրահրվում է քիմիական միացություններով՝ մուտագեններով: Որպես ուժեղ մուտագեն հայտնի է 5-բրոմուրացիլը, որը կապվում է թիմինի հետ, սակայն կարող է գույգվել նաև գուանինի հետ, եթե վերջինս գտնվի ենոլային վիճակում [8]: ԴՆԹ-ի կառուցվածքում սխալներ կարող են առաջանալ նաև այն դեպքում, երբ տեղի է ունեցել ինտերկալյացիա, քանի որ այդ դեպքում խախտվում է կրկնապատկումը:

Ինտերկալյատորները սովորաբար արոմատիկ օղակների խումբ պարունակող միացություններ են և շատ հաճախ դրանք հանդիսանում են մուտագեններ կամ ուռուցքածիններ: Այդ նյութերին են պատկանում ֆենանտրիդինները, այդ թվում, էթիդիումի բրոմիդը (ԷԲ), ինչպես նաև ակրիդինները, որոնց թվում նաև ակրիդին նարնջագույնը (ԱՆ), պրոֆլավինը (ՊՖ), ակտինոմիցին Դ-ն (ԱՄԴ), ՄԿ-ը և այլն [9]:

Ինտերկալյատորները, կապվելով ԴՆԹ-ի հետ, առաջացնում են տեղային կառուցվածքային փոփոխություններ վերջինիս մոլեկուլում, որի հետևանքով փոփոխվում է կոմպլեքսների ազատ էներգիան: Ինտերկալյացիայի արդյունքում ԴՆԹ-ի մոլեկուլի երկարությունն աճում է, որի հետևանքով լուծույթի մածուցիկությունը մեծանում է, իսկ սեղիմենտացման հաստատունը փոքրանում է: Ինտերկալյացիայի մոդելն առաջին անգամ առաջարկվել է Լերմանի կողմից (նկ. 1) [2,5]:

Գուրսկու և համահեղինակների կողմից առաջարկվել է ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման մեկ այլ մոդել, համաձայն որի լիզանդի մոլեկուլները տեղակայվում են ԴՆԹ-ի փոքր, ավելի հիդրոֆոբ ակոսում, ինչպես նաև էլեկտրաստատիկ փոխազդեցության մեջ են մտնում նրա ֆոսֆատային խմբերի հետ:

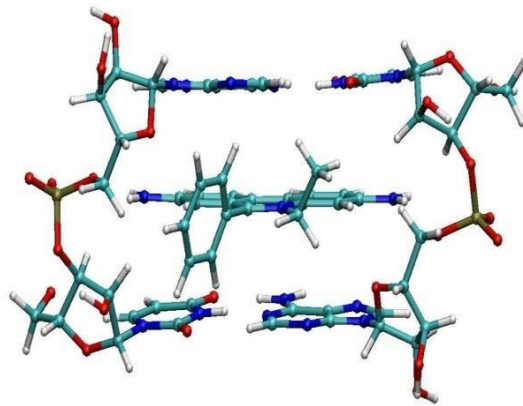
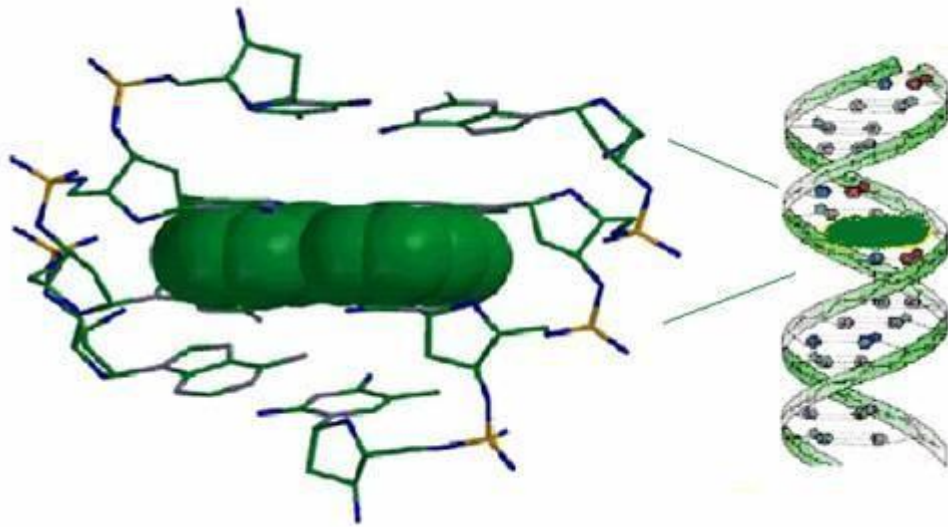
Պիկոկի և համահեղինակների կողմից առաջարկվել է ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման ինտերկալյացիայի՝ Լերմանի մոդելից տարբերվող մեխանիզմ: Մասնավորապես, ըստ այդ մոդելի, ինտերկալյատորի քրոմոֆորային օղակները ներդրվում են ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկում՝ հարևան հիմքերի հարթությունների միջև և կարող են ունենալ կամայական կողմնորոշում (տես [9]):

ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոն մեխանիզմով կապվող լիզանդները մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում, քանի որ դրանք դրսևորում են կենսաբանական մեծ ակտիվություն [10-14]:

Ի տարբերություն ակոսում կապվող լիզանդների, ինտերկալատորները (նկ. 2) բնութագրվում են ԴՆԹ-ի նկատմամբ ավելի փոքր խնամակցությամբ և, չնայած այն հանգամանքին, որ դրանց մեծ մասի համար ստացված են կապման հաստատունի արժեքները, այնուամենայնիվ, ԴՆԹ-ի հետ դրանց կոմպլեքսների բնութագրական թերմոդինամիկ մեծությունների՝  $\Delta H^{\circ}$ -ի և  $\Delta S^{\circ}$ -ի հավաստի արժեքների վերաբերյալ գրական տվյալները խիստ սակավաթիվ են [2,15,16]: Ճշգրիտ քանակական տվյալների բացակայությունը փոքր հնարավորություններ է ընձեռում կիրառելու ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալատորների կոմպլեքսների առաջացման թերմոդինամիկ հավանականության հնարավորությունը՝ կենսաբանական ակտիվ միացությունների ընտրության համար:

Որոշակի արդյունքներ ստացված են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և պրոպիդիումի յոդի (ՊՅ) կոմպլեքսագոյացման ազատ էներգիայի փոփոխության՝  $\Delta G^{\circ}$ -ի ճշգրիտ գնահատման դեպքում: Ցույց է տրվել, որ այդ դասական ինտերկալատորների միացումը ԴՆԹ-ի հետ հանգեցնում է գրեթե միանման հիդրոֆոր և վան-դեր-Վաալսյան էֆեկտների՝ ինտերկալացիայի տեղամասում [17]:

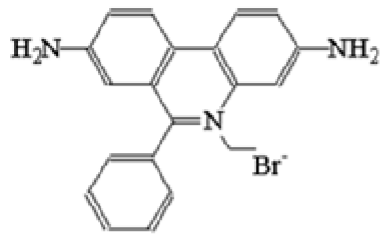
Անտրացիկլինային միացություն նոգալամիցինը (նկ. 2) նախընտրելիորեն կապվում է ԿրԳ հաջորդականությունների շաքարային մնացորդների հետ՝ ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: Այդ կոմպլեքսների կառուցվածքը ստացվել է ռենտգենակառուցվածքային վերլուծության (ՌԿՎ) և միջուկային մագնիսական ռեզոնանսային (ՄՄՌ) սպեկտրասկոպիայի մեթոդներով:  $^1\text{H}$  և  $^{31}\text{P}$  ատոմների ՄՄՌ սպեկտրները բնութագրվում են մեծ փոփոխություններով, որոնք առաջանում են նոգալամիցինի ինտերկալացիայի արդյունքում: Ընդ որում, մեծ շեղումը դեպի փոքր դաշտեր բնութագրում է B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub> անցում ԿրԳ հաջորդականություններում [18]: Դա բերում է ԴՆԹ-ի պարույրի ետ ոլորմանը, քանի որ ինտերկալացիայի համար անհրաժեշտ է, որպեսզի գույգ հիմքերը հեռանան իրարից: Ընդ որում, ԴՆԹ-ի տվյալ պարույրին բնորոշ տորսիոն անկյունների այլ պարամետրեր նույնպես փոփոխվում են, որպեսզի ինտերկալատորի մոլեկուլը տեղավորվի առաջացող խոռոչում:



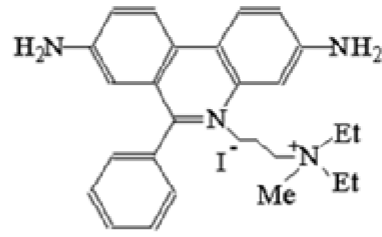
Նկար 1. ԴՆԹ-ի հետ լիգանդի կապման ինտերկալացիոն մեխանիզմը:

Նոգալամիցինը ինտերկալացվում է d(ATGCAT)-d(TACGTA) պոլինուկլեոտիդների TpG/ApC հաջորդականություններով հատվածներում, ընդ որում, թիմինային մնացորդի շաքարային օղակը գտնվում է C3-էնդո կոնֆորմացիոն վիճակում, մինչդեռ շաքարային մյուս խմբերը հիմնականում մնում են C2-էնդո կոնֆորմացիոն վիճակում: Այսպիսով, ինտերկալացիայի տեղամասում CpA երկնուկլեոտիդային հատվածը ենթարկվում է B<sub>2</sub> կոնֆորմացիոն փոխարկման՝ այդ կոնֆորմացիային բնորոշ պարամետրերի համապատասխան փոփոխություններով: Ինտերկալացիայի տեղամասին հարող մյուս մնացորդների տեղային կառուցվածքները ենթարկվում են աննշան փոփոխության:

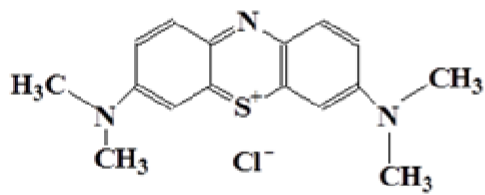
Արմատիկ օղակի ինտերկալացիայի համար անհրաժեշտ է, որպեսզի ԴՆԹ-ի պարույրը ետ ոլորվի մոտավորապես 20°-ով՝ ի տարբերություն B-ԴՆԹ-ում հարևան զույգերի՝ միմյանց նկատմամբ բնորոշ 36° պտույտին: Այդ դեպքում ռայզինգը պետք է փոփոխվի 7Å-ով, որպեսզի հիմքերի զույգերն իրարից հեռանան 3,4Å-ով, որը համապատասխանում է հիմքերի զույգերի միջև հեռավորությանը ԴՆԹ-ի պարույրում: Այդ հեռավորության դեպքում միայն լիզանդի մոլեկուլը կարող է ներդրվել հիմքերի զույգերի հարթությունների միջև: Այս փոփոխությունները հանգեցնում են նրան, որ հիմքերի երկու զույգերի պարույրային այլ պարամետրեր ևս ենթարկվում են փոփոխության և նույնիսկ մոլեկուլային-դինամիկ սահմանափակ մոդելավորման (ՄԴՄ) դեպքում այդ պարամետրերը տատանվում են միջին արժեքների շուրջը: Այսպիսով, լիզանդի մոլեկուլի ինտերկալացիան էական աղճատումներ է հրահրում ԴՆԹ-ի կառուցվածքում և հանգեցնում է պոտենցիալ էներգիայի մեծացմանը: Ինտերկալացիայի արդյունքում տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի պարույրի բեկում, ստեղծվում փոխազդեցության խախտում և պարույրի առանցքների շեղում՝ ինտերկալացիայի տեղամասից վերև և ներքև գտնվող հատվածներում [18-24]: Ստեղծվող խախտումը հիմքերի զույգերի միջև փոխհատուցվում է դրանց և ինտերկալատորի մոլեկուլի միջև վան-դեր-Վաալսյան և էլեկտրաստատիկ նոր փոխազդեցությունների առաջացմամբ: Չնայած լիզանդների ինտերկալացիայի արդյունքում ԴՆԹ-ի պարույրը զգալի կառուցվածքային փոփոխությունների է ենթարկվում, այնուամենայնիվ այն ընդհանուր առմամբ պահպանում է իր B-ձևը, քանի որ վերը նշված փոփոխությունները պարույրի երկարությամբ չեն տարածվում մեծ հեռավորությունների վրա:



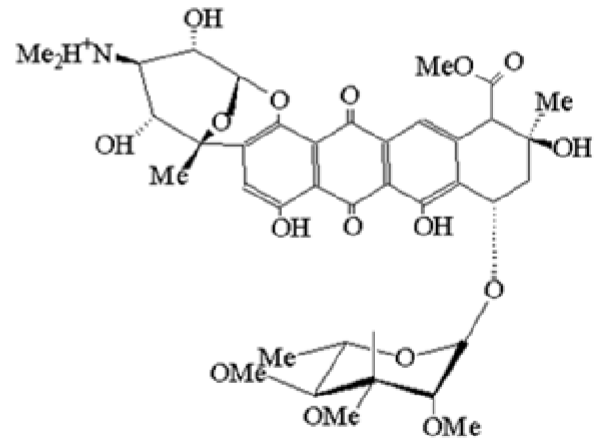
Էթիլիումի բրոմիդ



Պրոպիլիումի յոդիդ



Մեթիլեն Կապույտ



Նուզամիցին

Նկար 2. Որոշ հնտերկալյատորների քիմիական կառուցվածքը:

Այդ մասին է վկայում այն, որ ԴՆԹ-ի շաքարա-ֆոսֆատային կմախքն ընդհանուր առմամբ պահպանում է իր ճկունությունը, քանի որ մեծ փոփոխություններն արագ մարում են ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի ազատության աստիճանների մեծ թվի հետևանքով [25]:

Ինտերկալյացիոն փոխազդեցության դասական օրինակ է ԷԲ-ի միացումը ԴՆԹ-ի հետ, որն ուսումնասիրվել է փորձարարական տարբեր մեթոդներով և դրանց միջոցով որոշվել են կապման կինետիկ և թերմոդինամիկ պարամետրերը: Այդ պարամետրերը ցույց են տվել, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը ոչ կոոպերատիվ պրոցես է և տեղի է ունենում երկու փուլերով: Առաջին փուլում լիզանդի մոլեկուլը արագ կապվում է ԴՆԹ-ի պարույրի եզրերին, որից հետո ԷԲ-ի քրոմոֆորային խումբը ներթափանցում է հիմքերի հարթությունների մեջ: Հատկանշական է, որ ԴՆԹ-ի պարույրի եզրերին լիզանդի միացումը բնութագրվում է կապման հաստատունի ավելի փոքր արժեքով (երկու կարգով)՝ ինտերկալյացիային բնորոշ կապման հաստատունի համեմատ [11-20]: Ինտերկալյացիայի հետևանքով ԴՆԹ-ի պարույրը ետ է ոլորվում 10-20°-ով, ուստի գերպարույրների դեպքում, ինտերկալյատորի կոնցենտրացիայից կախված, աջակողմյան գերպարույրներն սկզբում անցնում են պարզ օղակաձև տեսքի, այնուհետև առաջացնում են ձախակողմյան գերպարույրներ:

Այդ տվյալները հաստատվել են ՌԿՎ հետազոտություններով, որոնք ցույց են տվել, որ լիզանդի մոլեկուլները տեղաբաշխվում են հիմքերի երկու հարևան զույգերի միջև, եթե դրանցից մեկի 5'-ծայրում պիրիմիդինային մնացորդ է, 3'-ծայրում՝ պուրինային: Եթե ազոտային հիմքերի տեղերը փոխվեն, ապա կոմպլեքսներ գործնականում կամ չեն առաջանա, կամ դրանք չեն ունենա պարույրային կառուցվածք [17-20]: Պիրիմիդին-3',5'-պուրին հաջորդականության դեպքում ազոտային հիմքերն ավելի մեծ չափով են վերածածկվում լիզանդի մոլեկուլի հարթության հետ, քան հակառակ դասավորվածության դեպքում, իսկ ազատ էներգիայի տարբերությունը կազմում է 7-13 կկալ/մոլ: Պիրիմիդին-3',5'-պուրին հաջորդականության դեպքում միջմոլեկուլային փոխազդեցությունները կայունացվում են ներմոլեկուլային էլեկտրաստատիկ ուժերով, մինչդեռ հակառակ հաջորդականության դեպքում կարող են առաջանալ էներգիայի տեսանկյունից տարածականորեն անցանկալի հպումներ, որոնք զգալիորեն դժվարեցնում են ինտերկալյացիան [8,9]:

### 1.1.2. ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում լիզանդների կապման մեխանիզմը

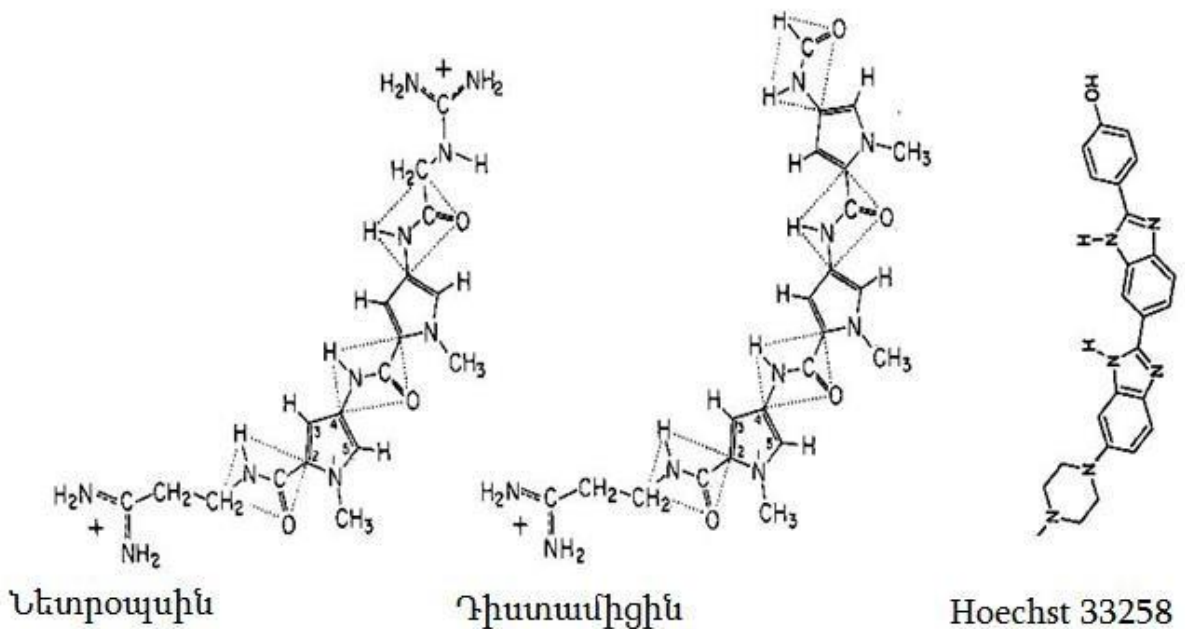
Լիզանդների կապման մեկ այլ մեխանիզմ է ոչ ինտերկալյացիոն փոխազդեցությունը, երբ լիզանդի մոլեկուլը տեղակայվում է ԴՆԹ-ի ակոսներից մեկում՝ գլխավոր առանցքին զուգահեռ: Մասնավորապես, ցույց է տրված, որ նետրոպսինը, Hoechst միացությունը և դրանց ածանցյալները մեծ խնամակցությամբ կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում՝ ԱԹ զույգերից կազմված հաջորդականությունների հետ [25-27]: Ընդ որում պետք է նշել, որ լիզանդների ինտերկալյացիան և ոչ ինտերկալյացիոն փոխազդեցությունը տարբեր կերպ են ազդում ԴՆԹ-ի ճկունության վրա [28,29]: Ինտերկալյացիայի դեպքում ԴՆԹ-ի մոլեկուլի (երկշղթա պարույրի) ճկունությունը մեծանում է, մինչդեռ ակոսում կապման դեպքում ԴՆԹ-ի այդ տեղամասերը “կոշտանում” են, մինչդեռ այդ տեղամասերին հարող հատվածները մնում են ճկուն [29]:

Ակոսում կապվող լիզանդների նկատմամբ հետաքրքրությունը պայմանավորված է նրանով, որ դրանք որոշակի ընտրողականություն են ցուցաբերում ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների նկատմամբ և դրանց հետ կապվում են մեծ խնամակցությամբ: Օժտված լինելով կենսաբանական բարձր ակտիվությամբ՝ այս լիզանդները ձեռք են բերել կիրառական նշանակություն, հատկապես, ուռուցքների թերապիայում: Այդ տեսակետից լեքսիտրոպսինների դասին պատկանող մի շարք օլիգոպեպտիդային միացություններ, օրինակ՝ նետրոպսինը, դիստամիցինը, ինչպես նաև բիս-ամիդները (նկ. 3) կիրառվում են որպես զոնդեր՝ ԴՆԹ-ի որոշակի հաջորդականությունները ճանաչելու համար [28-32]: Բիս-ամիդային միացությունները նաև օժտված են չափավոր հակավիրուսային և հակաբակտերիալ հատկություններով և պատկանում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում կապվող լիզանդների ընտանիքին:

Դրանց մեծ մասը երկկատիոնային միացություններ են և ցուցաբերում են  $1 \pm 10$  մկմոլ խնամակցություն՝ ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում ԱԹ զույգերի հետ կապվելիս [33-35]: Ընդ որում, բացահայտվել է լավ արտահայտված համահարաբերակցություն այդ միացությունների կենսաբանական ակտիվության և ԴՆԹ-ի նկատմամբ դրանց խնամակցության միջև [33-35]: Միջուկային մագնիսական ռեզոնանսային (ՄՄՌ) սպեկտրասկոպիայի մեթոդով ցույց է տրվել, որ տեղի է ունենում պրոտոնի արագ կամ չափավոր արագ փոխանակում՝ ԴՆԹ-ի հետ բիս-ամիդների կոմպլեքսների առաջացման

դեպքում, որը լավ համապատասխանության մեջ է սպեկտրասկոպիկ և այլ մեթոդներով ստացված տվյալների հետ [2]:

Մուլեկուլային և մուլեկուլային-դինամիկ մոդելավորման մեթոդները (NOE (Nuclear Overhauser Effect)) և ՄՄՌ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ այդպիսի միացություններից մեկը՝ բերենիլը, փոքր ակոսում անհամաչափ է տեղաբաշխվում ԴՆԹ-ի երկրորդ կարգի կեղծ առանցքի նկատմամբ և զբաղեցնում է 5'-AATT և 5'-AAATTT հաջորդականություններ պարունակող տեղամասեր [30,31]: Սակայն այս տվյալները հակասության մեջ են գտնվում ավելի վաղ ստացված բյուրեղագրաֆիկական արդյունքների հետ, որոնք հայտնաբերել էին լիգանդի մուլեկուլների համաչափ տեղաբաշխում այդ նույն հատվածներում [36-38]: Որակապես նմանատիպ արդյունքներ են ստացված նաև նուկլեոտիդային կրկնակի շղթաներից կազմված պարույրների և 5'-



Նկար 3. ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում կապվող միացությունների քիմիական կառուցվածքը:



ԱԱԹ ոչ կոմպլեմենտար երկպարույրների հետ պրոպամիդինի և պենտամիդինի ընտանիքների լիզանդների կոմպլեքսների համար [26,27]:

Այդ տվյալների հիման վրա ստացված հիմնական եզրահանգումն այն է, որ բերենիլը զբաղեցնում է  $A_nT_n$  հաջորդականություններում առկա իրար մոտ տեղադրված իզոներգետիկ տեղամասերը:

Կինետիկ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ լիզանդի կապման հաստատունի արժեքը գրեթե համընկնում է դիֆուզիոն-սահմանափակ ռեակցիայի թվացյալ հաստատունի արժեքի հետ, իսկ խնամակցության դիտվող տարբերությունները համահարաբերակցում են հիմնականում կոմպլեքսների դիսոցիան հաստատունի հետ [26]:  $^{31}\text{P}$ -ի ՄՄՌ սպեկտրների վերլուծությունը NOE մեթոդով ցույց է տալիս նաև, որ լիզանդի մոլեկուլները աննշան են ազդում  $^{13}\text{C}$ -ի ազոտային հիմքերի զույգման հաստատունի և պարույրի տորսիոն անկյունների պտտման գլիկոզիլային անկյան վրա: Դա վկայում է, որ լիզանդների հետ կոմպլեքսագոյացման ժամանակ  $^{13}\text{C}$ -ի պարույրը գործնականում որևէ փոփոխության չի ենթարկվում, ընդ որում, այս տվյալները համապատասխանության մեջ են կինետիկ հետազոտությունների արդյունքների հետ: Այդ տվյալները նաև վկայում են, որ լիզանդի մոլեկուլները տեղակայվում են  $^{13}\text{C}$ -ի պարույրի գլխավոր առանցքի երկայնքով [2]:

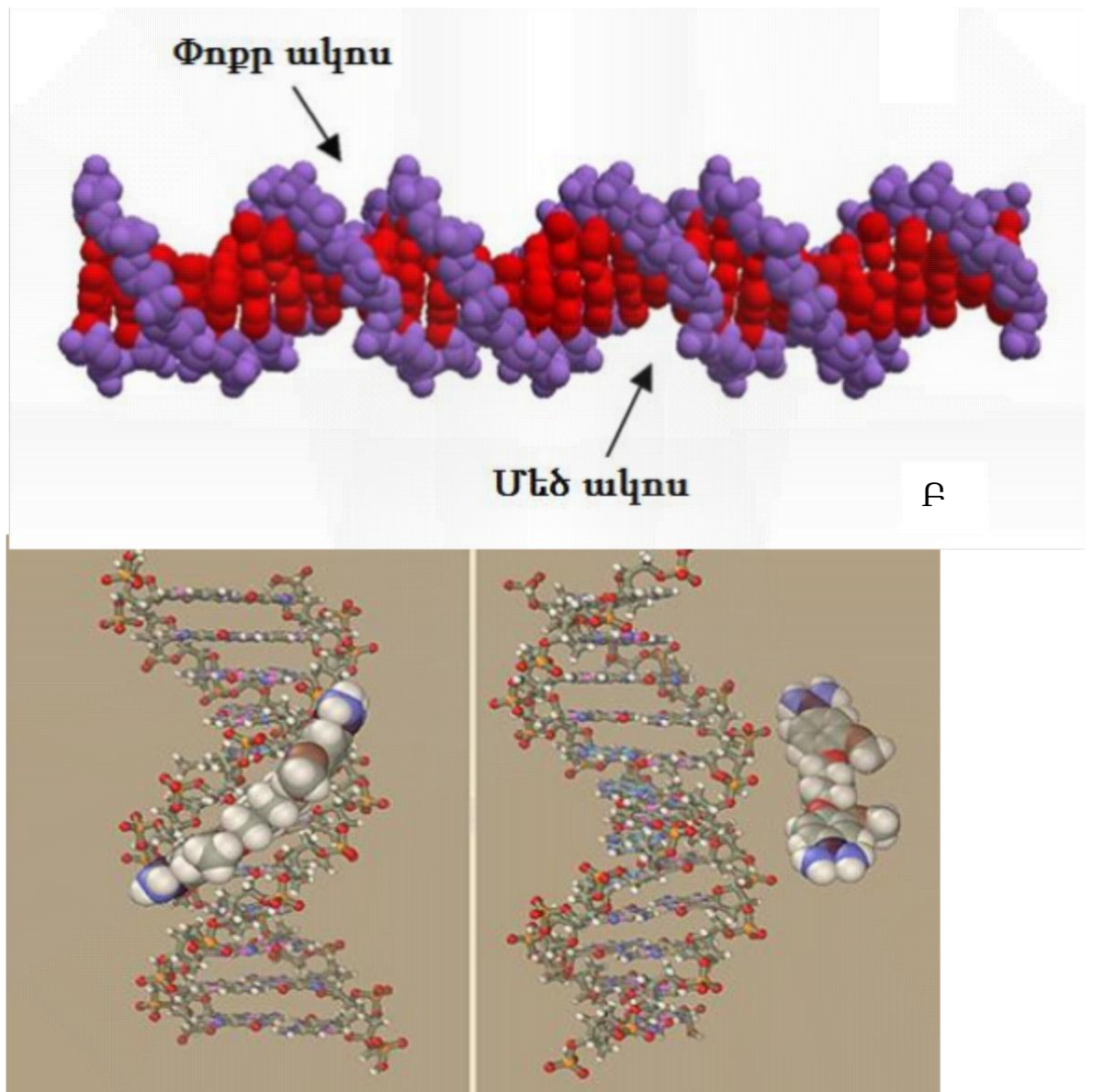
Կոմպլեքսները կայունանում են վան-դեր-Վաալսյան փոխազդեցություններով, որոնք առաջանում են  $^{13}\text{C}$ -ի փոքր ակոսի պատերի և լիզանդի մոլեկուլների միջև, ինչպես նաև լիզանդի մոլեկուլների ամիդային խմբերի և  $^{13}\text{C}$ -ի ազոտային հիմքերի միջև ձևավորվող ջրածնական կապերի հաշվին: Ընդ որում, կոմպլեքսների կայունացման մեջ կարևոր ներդրում ունի էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունը, որը ծագում է լիզանդի դրական լիցքավորված մոլեկուլների և  $^{13}\text{C}$ -ի բացասական լիցքավորված շաքարա-ֆոսֆատային խմբերի միջև:

Լիզանդի սպեցիֆիկությունը զգալիորեն պայմանավորված է դրա մոլեկուլի և  $^{13}\text{C}$ -ի փոքր ակոսի երկրաչափական համապատասխանությամբ (նկ. 4): Այդ տեսակետից, պրոպամիդինի և պենտամիդինի սպեցիֆիկությունը  $^{13}\text{C}$ -ի համապատասխան հաջորդականությունների նկատմամբ նվազում է բերենիլի համեմատ, քանի որ դրանք ունեն ավելի մեծ չափեր և առաջացնում են ավելի ճկուն կապեր, ինչը հրահրում է ենթրոպիայի անցանկալի փոփոխություններ՝  $^{13}\text{C}$ -ի փոքր

ակոսում այդ մոլեկուլների տեղակայման ժամանակ [2]: Պոտենցիալ էներգիայի հաշվարկները և մոլեկուլային մոդելավորումը կարող են հարաբերականորեն մեծ ճշգրտությամբ կանխագուշակել բիս-ամիդային միացությունների միացումը ԴՆԹ-ի հետ և բացատրել AT նախընտրելի ճանաչումը:

5'-AATT և 5'-AAATTT հաջորդականությունների երկշղթա պարույրների ՄՄՌ հետազոտությունները ցույց են տվել հիդրատացիոն ջրի առկայությունը փոքր ակոսում՝ ադենինների հարևանությամբ, քանի որ բոլոր A(H<sub>2</sub>) խմբերը ջրի նկատմամբ ունեցել են NOE-ի բացասական արժեքներ: Սակայն պրոպամիդինի կապման ժամանակ հիդրատային թաղանթի արտաքին կողմում ջրի որոշ մոլեկուլներ տեղակալվում են, մինչդեռ մյուսները մնում են կապված ԴՆԹ-ի, ինչպես նաև լիզանդի կապված մոլեկուլների հետ [26,31]: Դա ցույց է տալիս, որ լիզանդի մոլեկուլների կապման դեպքում դուրս մղված ջրի քանակը ավելի փոքր է, քան սպասվում էր, եթե հաշվի են առնվում միայն մոլեկուլային ծավալները, որն էլ հանգեցնում է կապման էներգիայի փոփոխության նվազմանը: Հիմք ընդունելով այն փաստը, որ ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդների կապման ազատ էներգիայի փոփոխությունը չի որոշվել, հաշվի չի առնվել էլեկտրաստատիկ փոխազդեցության ներդրումը, իսկ վան-դեր-Վաալսյան փոխազդեցությունները և ջրածնական կապերը փոքր ներդրում ունեն կապման էներգիայի արժեքում, առաջարկվել է վարկած, ըստ որի հիդրատային թաղանթից ջրի մոլեկուլների դուրս մղման դեպքում էներգիայի փոփոխությունը հանդիսանում է ԴՆԹ-ի հետ լիզանդի կապման շարժիչ ուժը [2]:

Լեքսիտրոպսինների ընտանիքի միացությունները, մասնավորապես, նետրոպսինը, դիստամիցինը նույնպես սպեցիֆիկություն են դրսևորում ԴՆԹ-ի ԱԹ հաջորդականությունների նկատմամբ [14]: Այդ լիզանդները նախընտրելիորեն տեղակայվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում՝ AT հարուստ հատվածներում: Սակայն կարևոր նշանակություն ունի նաև այդ հատվածների նուկլեոտիդային հաջորդականությունը: Մասնավորապես, 5'-AATT և 5'-ATAT հաջորդականությունների հետ այդ լիզանդները ավելի նախընտրողաբար են կապվում, քան 5'-TTAA և 5'-TATA-ի հետ: Հաջորդականությունների նկատմամբ այդպիսի ընտրողականությունը պայմանավորված է հաջորդականություններից կախված ԴՆԹ-ի փոքր ակոսի լայնության փոփոխությամբ, ինչպես նաև նրանով, որ թիմին-ֆոսֆատ-Ադենին (TрА)



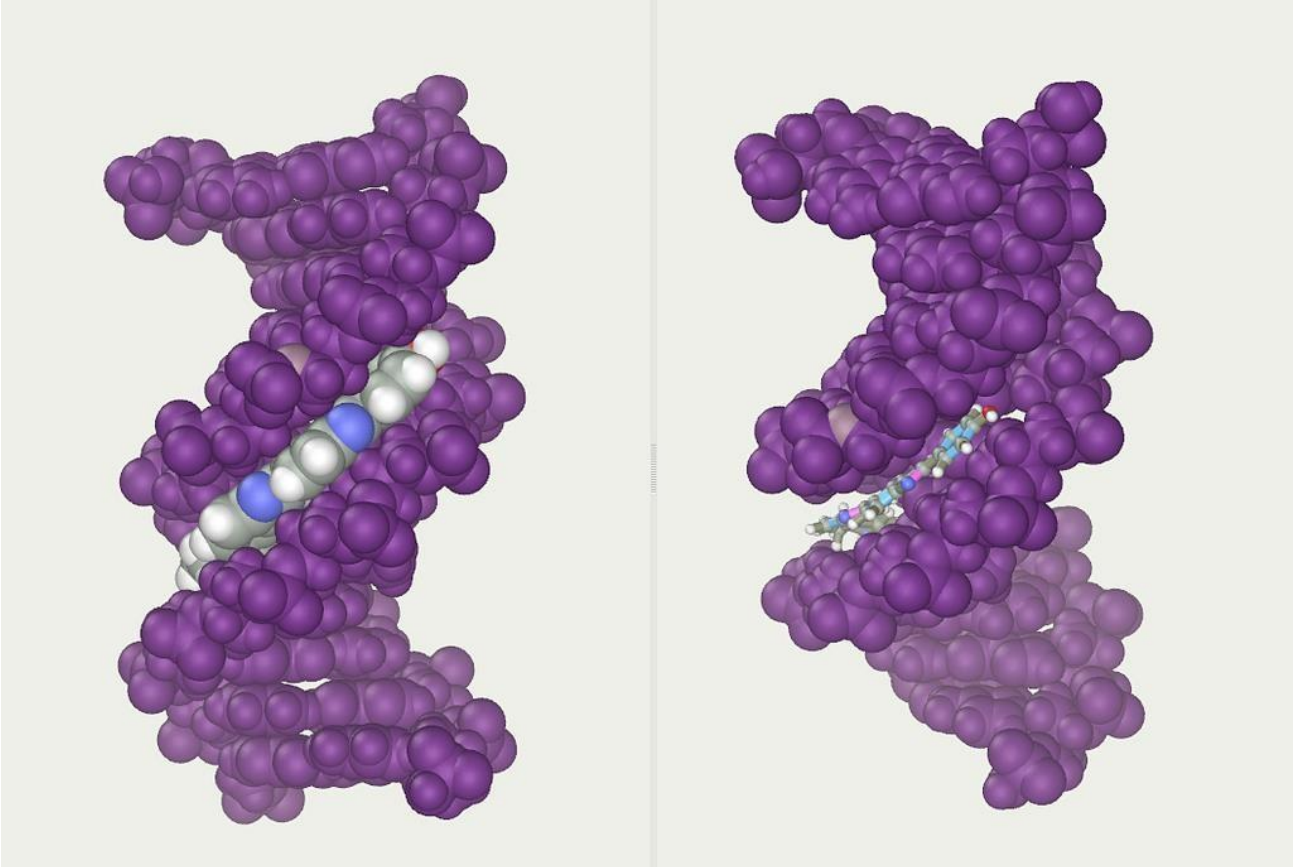
Նկար 4. Ա) ԴՆԹ-ի փոքր և մեծ ակնուները; Բ) Լիզանդի տեղակայումը ԴՆԹ-ի փոքր ակնուում:

հաջորդականություններն ունեն անսովոր մեծ ճկունություն, ինչը ցանկալի չէ կոմպլեքսների առաջացման համար [39-47]:

Լիզանդների մեծ չափերը հանգեցնում են նրան, որ կապման տեղամասը ԴՆԹ-ի վրա ընդգրկում է ազոտային հիմքերի 5-6 զույգեր [16]: Կառուցվածքային վերլուծությունները ցույց են տվել, որ լիզանդի մոլեկուլների կողմից սպեցիֆիկությունը ԴՆԹ-ի որոշակի հաջորդականությունների նկատմամբ պայմանավորված է AT զույգերի ակցեպտորային խմբերի (N3 կամ O2) միջև ջրածնական կապերով, ինչպես նաև փոքր ակոսի հատակի և պատերի և լիզանդի մոլեկուլների միջև էլեկտրաստատիկ և վան-դեր-Վաալսյան փոխազդեցություններով [2,46,47]:

Շաքարի O4' ատոմների և լիզանդի պիրոլային օղակների միջև ստեղծվող փոխազդեցությունները նույնպես կայունացնում են կոմպլեքսները: ԴՆԹ-ի հետ լեքսիտրոպսինն առաջացնում է երեք կենտրոնական ջրածնական կապեր և ջրային կամրջակներ, որը համարժեք է մաքուր ԴՆԹ-ի բյուրեղային կառուցվածում հայտնաբերվող ջրային “կմախքի” համարժեքը: Համաձայն կառուցվածքային հետազոտությունների տվյալների, լեքսիտրոպսինների ներթափանցումը ԴՆԹ-ի փոքր ակոս ուղեկցվում է մեծ խնամակցությամբ, էնթալպիայի էկզոթերմիկ և էնթրոպիայի շահավետ փոփոխություններով: Ընդհանուր առմամբ, ԴՆԹ-ի հետ լեքսիտրոպսինների փոխազդեցությունը բնութագրվում է էնթալպիայի և էնթրոպիայի փոփոխությունների փոխհատուցվող մեխանիզմով, որը նաև տեղի ունի այլ լիզանդների դեպքում:  $A_3T_2 \cdot T_3$  հաջորդականության երկշղթա պարույրների հետ լիզանդների կապման հետազոտությունները ի հայտ են բերել, որ նետրոպսինի կապման հաստատունի արժեքը  $K=4,3 \times 10^7 \text{ մոլ}^{-1}$  ( $\Delta H=-7,5 \text{ կկալ/մոլ}$ ,  $\Delta S=-9,3 \text{ կալ/մոլ} \cdot K$  և  $\sim 0 \text{ կալ/մոլ} \cdot K$ )՝ ԴՆԹ/լիզանդ=1:1 հարաբերության, իսկ դիստամիցինի՝  $0 \rightarrow 1:1$  և  $1:1 \rightarrow 2:1$  հարաբերությամբ հաջորդական կապման դեպքում  $K_1=3,1 \times 10^7 \text{ մոլ}^{-1}$  ( $\Delta C_p = -42 \text{ կալ/մոլ} \cdot K$ ) և  $K_2=3,3 \times 10^6 \text{ մոլ}^{-1}$  ( $\Delta C_p = -196 \text{ կալ/մոլ} \cdot K$ ) [32, 48]:

Լեքսիտրոպսինների մեծ խնամակցությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ խթանել է դրանց կիրառությունը որպես թերմոդինամիկ զոնդերի՝ ԴՆԹ-ի կամ սինթետիկ երկշղթա AT հաջորդականությունների փոքր ակոսի հիդրատացման աստիճանի որոշման ուսումնասիրություններում [47]:



Նկար 5. Hoechst 33258 –ի տեղակայումը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում:

ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում լիզանդի մոլեկուլների տեղակայման ազատ էներգիայի գնահատումը իրականացվել է Hoechst 33258 (H33258) միացության կոմպլեքսների (նկ. 5)՝ իզոթերմիկ տիտրման կալորիմետրիկ (ԻՏԿ) մեթոդի միջոցով [12,13]: ԻՏԿ մեթոդը թույլ է տալիս անմիջականորեն չափել թերմոդինամիկ պարամետրերը և դրա միջոցով ստացվել են  $d(CGCAAATTTGCG)_2$  օլիգոնուկլեոտիդի հետ տարբեր լիզանդների կապման թերմոդինամիկ կորերը՝ 1:1 հարաբերության դեպքում (կենտրոնական  $[AsT_3]$  դուպլեքսը հանդիսանում է կապման միակ տեղամասը) [49,52]: H33258 կապման դեպքում  $\Delta H$ -ի մեծությունը դրական է (երբ ջերմաստիճանը եղել է  $37^\circ C$ ), ինչը վկայում է կապման էնթալպիկ բնույթի մասին [12,13]:

Այնուամենայնիվ, այս տվյալները հակասության մեջ են գտնվում ԴՆԹ-ի և երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ այլ լիզանդների կոմպլեքսների համար ստացված արդյունքների հետ: Ընդ որում, դրական մեծ լիցք ունեցող և ավելի թույլ կապվող լիզանդների, մասնավորապես, բիս-ամիդային միացությունների դեպքում  $\Delta G^\circ$ -ի արժեքի վրա պոլիէլեկտրոլիտային բաղադրիչի ներդրումը եղել է փոքր և հավասարվել է ԴՆԹ-ի հետ միավալենտ կատիոնների փոխազդեցության դեպքում ակնկալվող արժեքներին:  $\Delta H$ -ի դրական փոփոխությունը բացատրվում է այն փաստով, որ ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի կապման հաստատունի արժեքը ( $K_a \sim 10^8 \text{ մոլ}^{-1}$ ) մեծ է՝  $\Delta G_{\text{պոլիէլեկտ}}$ -ի բավականին մեծ ներդրման հետևանքով՝ ի տարբերություն բիս-ամիդային միացությունների:

Կառուցվածքային հետազոտությունները բացահայտել են, որ մեծ թվով լիզանդներ, այդ թվում նաև H33258-ը, որոնք կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում, հանդիսանում են կոշտ մոլեկուլներ [2]:

Այսպիսով, կոմպլեքսների առաջացման ժամանակ ոչ լիզանդի մոլեկուլները, ոչ էլ ԴՆԹ-ն կոնֆորմացիոն փոփոխությունների չեն ենթարկվում, ինչի մասին վկայում է այն, որ  $\Delta G_{\text{կոնֆ}}$  բաղադրիչի ներդրումը աննշան է: Հատկանշական է, որ կոմպլեքսների առաջացման պրոցեսում ազատ էներգիայի արժեքի մեջ սպեցիֆիկ ատոմային փոխազդեցությունների ներդրումը ևս փոքր է [2]:

Թերմոդինամիկ վերլուծությունը ցույց է տվել, որ ԴՆԹ-ի կապված և ազատ վիճակներում ջրածնային կապերի փոխանակության պրոցեսը գրեթե իզոէներգետիկ է (իրականում թույլ անշահավետ է), իսկ կոմպլեքսների առաջացման շարժիչ ուժ հանդիսանում են պոլիէլեկտրոլիտային և հիդրոֆոր էֆեկտները:

Լավ համաձայնություն է ստացվել նաև փորձարարական ( $-330$  կալ/մոլ (1մոլ գույգ հիմք)) և  $\Delta C_p$  արժեքների միջև, որը հաշվարկվել է լուծիչին մատչելի մակերևույթի (LUS) համար: Այս հետազոտությունը հանդիսանում է կառուցվածք/թերմոդինամիկ փոխազդեցություն էմպիրիկ հարաբերության առաջին կիրառությունը ԴՆԹ-լիզանդ կամայական համակարգերի համար [2]:

Այսպիսով, ԴՆԹ-ի հետ ոչ ինտերկալյացիոն մեխանիզմով կապվող լիզանդների փոխազդեցության թերմոդինամիկ պարամետրերը բացահայտում են հետևյալը. կապման ջերմունակության փոփոխությունները զգալի են և բացասական՝ տարբերություն աշխատանք [14]-ում ստացված տվյալների, որտեղ ցույց է տրվել, որ նետրոպսինի դեպքում  $\Delta C_p \sim 0$ :

Մյուս կողմից, սակայն, այդ տվյալները լավ համապատասխանության մեջ են  $A_3T_3$ -Hoechst կոմպլեքսների համար ստացված արդյունքների հետ [13]: Բացի այդ, որոշ լիզանդների դեպքում  $25^\circ\text{C}$ -ում փոխազդեցությունը պայմանավորված է էնթալպիայի, մինչդեռ Hoechst-ի և բերենիլի դեպքում՝ էնթոպիայի փոփոխությամբ:

Տարբեր մոլեկուլային զանգվածներով լիզանդների դեպքում աննշան համապատասխանություն է հայտնաբերվել նաև  $T\Delta S$ -ի և  $\Delta C_p$ -ի արժեքների միջև: Լիզանդի մոլեկուլների կապման դեպքում LUS-ի բևեռային և ոչբևեռային փոփոխությունները և դրա հետևանքով  $\Delta C_p$ -ի արժեքը հաշվարկվել են ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների ատոմային կոորդինատների, ՄՄՌ տվյալների և բյուրեղագրաֆիական հետազոտությունների միջոցով [8]: Հայտնաբերվել է համապատասխանություն  $\Delta C_p$ -ի փորձարարական և հաշվարկային տվյալների միջև այն լիզանդների դեպքում, որոնք կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: Դա պայմանավորված է նրանով, որ կոմպլեքսների առաջացման ժամանակ տեղի է ունենում LUS-ի փոփոխություն ինչպես բևեռային, այնպես էլ ոչ բևեռային լուծույթներում [2]:

## 1.2. ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և ՄԿ-ի կապման առանձնահատկությունները

Նուկլեինաթթուների հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության սպեկտրաֆոտոմետրիկ մեթոդներով հետազոտությունները բացահայտել են, որ այդ լիզանդը ԴՆԹ-ի հետ առաջացնում է երկու տիպի կոմպլեքսներ՝ ուժեղ և թույլ, ընդ որում հայտնաբերվել է, որ

փոխազդեցության էնթրոպիան էականորեն փոփոխվում է, որից ենթադրվում է, որ ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդի ուժեղ տիպի կոմպլեքսն ունի ինտերկալյացիոն բնույթ: Պոլիմուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության արդյունքում որոշակի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների նկատմամբ վառ արտահայտված սպեցիֆիկություն չի բացահայտվել:

Լուծույթներում ԷԲ-ն ձեռք է բերում դրական լիցք, իսկ նուկլեինաթթուները հանդիսանում են պոլիանիոններ, ինչը պայմանավորում է լիզանդի մոլեկուլների և ԴՆԹ-ի ֆոսֆատային խմբերի միջև էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունը: Ինտերկալյացիայի համեմատ այս եղանակը բնութագրվում է կապման հաստատունի ավելի փոքր արժեքով: Այդ մասին վկայում է նաև այն փաստը, որ իոնական ուժի մեծացումը հանգեցնում է էլեկտրաստատիկ (թույլ) եղանակով կապման հաստատունի փոքրացմանը: ԷԲ-ն առաջացնում է կոմպլեքսներ նաև ՌՆԹ-ի, այլ միաշղթա պոլիմուկլեոտիդների, դենատուրացված ԴՆԹ-ի հետ: Սակայն ենթադրվում էր, որ այդ լիզանդը ուժեղ եղանակով կապվում է պոլիմուկլեոտիդում առկա երկշղթա տեղամասերի հետ [9]:

ԷԲ-ի հետ միացման դեպքում լուծույթում ԴՆԹ-ի խտությունը նվազում է մինչև 0.15գ/սմ<sup>3</sup>: Ջրային լուծույթներում ազատ ԷԲ-ի կլանման մաքսիմումը համապատասխանում է 480նմ ալիքի երկարությանը, մինչդեռ ԴՆԹ-ի հետ կապված վիճակում այն առավելագույն կլանում է ցուցաբերում 520նմ-ի տակ: ԷԲ-ն պատկանում է այն ներկանյութերին, որոնք ունեն ֆլուորեսցենցիայի քվանտային փոփոխական էլք, որը նուկլեինաթթուների հետ կապման արդյունքում մեծանում է (երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ միացման դեպքում՝ 40-50 անգամ, միաշղթա ԴՆԹ-ի դեպքում՝ 10) [53,54]:

ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարումը թթվածնով կիրառվում է, որպեսզի պարզվի, թե ԴՆԹ-ի հիմքերի զույգերը կանխում են արդյոք թթվածնի մոլեկուլների մոտեցումը ԷԲ-ի կապված մոլեկուլներին: ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի միացման արդյունքում լիզանդի ֆլուորեսցենցիայի մարման տևողությունը 1,75-ից մեծանում է մինչև 20,5նվ: Այդ նպատակով, մարման երկմոլեկուլային հաստատունի ստացման համար հարկավոր է ստանալ մարման տևողությունը [54]: ԴՆԹ-ի բացակայության պայմաններում ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարման հաստատունը կազմում է  $0.346 \cdot 10^{10}$  մոլ<sup>-1</sup>, որը 3 անգամ փոքր է, քան սպասվում էր թթվածնով՝ դիֆուզիոն վերահսկվող ռեակցիաների մարման



դեպքում: Ամենայն հավանականությամբ, այդ փաստը պայմանավորված է լիզանդի կապված մոլեկուլների արոմատիկ օղակներին հարակից ծավալային խմբերի առկայությամբ: Թթվածնի մոլեկուլի բախումը E-ի մոլեկուլի չկապված խմբերի հետ չի հանգեցնում մարման: Հետևաբար, E-ի ներդրումը երկշղթա ԴՆԹ-ի հիմքերի գույգերի հարթությունների միջև հանգեցնում է մարման երկմոլեկուլային հաստատունի փոքրացմանը 30 անգամ: Դա պայմանավորված է ԴՆԹ-ի միջոցով E-ի կապված մոլեկուլների տարածական էկրանավորմամբ: ԴՆԹ-ի գույգ հիմքերը 2 կողմերից հարում են ֆլուորոֆորին և կանխում են փոխազդեցությունը թթվածնի մոլեկուլների հետ [54]:

Ակրիդինային միացությունները և նրանց ածանցյալները ցուցաբերում են վառ արտահայտված կենսաբանական ակտիվություն, հրահրում են մուտացիաների առաջացում ԴՆԹ-ում, ինչպես նաև օժտված են հակավիրուսային և հակաբակտերիալ հատկություններով, քանի որ արգելակում են ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի սինթեզը:

Ռենտգենակառուցվածքային վերլուծությունները ցույց են տվել, որ ակրիդինային միացությունների մեծ մասը կարող է ներթափանցել հիմքերի հարթությունների միջև (ինտերկալյացիա)՝ տեղաշարժելով հարակից ազոտային հիմքերը: Երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ակրիդին նարնջագույնը (ԱՆ) հիմնականում կապված է մոնոմերային ձևով, որը բնութագրվում է  $\lambda=504$  նմ-ում կլանման և  $\lambda=530$  նմ-ում ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումներով:

Դենատուրացված ԴՆԹ-ի, ինչպես նաև միաշղթա ՌՆԹ-ի հետ ԱՆ-ը կապվում է դիմերի ձևով [9]: Ցույց է տրված, որ ԱՆ-ի մոնոմերները տարբերվում են դիմերներից զրգռված մոլեկուլների կյանքի տևողությամբ՝  $\tau$ -ի արժեքով [8]: Ընդ որում, մոնոմերի տեսքով լուծույթում ԴՆԹ-ի հետ չկապված մոլեկուլների համար  $\tau=2,0 \cdot 10^{-9}$  վ, իսկ կապված մոլեկուլների համար՝  $\tau=5,0 \cdot 10^{-9}$  վ: ԱՆ-ի դիմերների կարմիր լուսարձակման պարբերությունը կազմում է  $\tau=22$  նվ: Այսպիսով, ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրը կախված է նուկլեինաթթվի կառուցվածքից (միաշղթա և երկշղթա) և ներկանյութի կոնցենտրացիայից [9]:

Բացի այդ, ԴՆԹ-ի հետ կապված վիճակում ԱՆ-ը կորցնում է իրեն բնորոշ որոշ քիմիական հատկություններ, որը ևս վկայում է ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդի կապման ինտերկալյացիոն բնույթի մասին: Ֆլուորեսցենցիայի այլ պարամետրերի, օրինակ՝

Էներգիայի արդյունավետ տեխնափոխության գրանցման միջոցով կարելի է դատել ԴՆԹ-ներկանյութ կոմպլեքսի կառուցվածքի մասին: Կապված վիճակում ԱՆ-ի ֆլուորեսցենցիան գրանցվում է ԴՆԹ-ի կլանման տիրույթում, ինչը վկայում է ազոտային հիմքերից ԱՆ-ի կապված մոլեկուլներին Էներգիայի ակտիվ տեղափոխության մասին: Հետագայում ցույց է տրվել, որ երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԱՆ-ի կոմպլեքսին բնորոշ է կանաչ, իսկ ՌՆԹ-ի հետ՝ կարմիր լյումինեսցենցիա: ԱՆ-ի կիրառումը հնարավորություն է տալիս նկարագրել ԴՆԹ-ՌՆԹ հարաբերությունը և լյումինեսցենցիաների ինտենսիվության հարաբերակցությունը սպեկտրի կարմիր և կանաչ տիրույթներում (տես [9]):

ԴՆԹ-ի հետ մեկ այլ լիզանդի՝ մեթիլեն կապույտի (ՄԿ) փոխազդեցությունը, ինչպես և ԷԲ-ի դեպքում, ուսումնասիրվել է տեսականորեն և փորձարարականորեն: ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության վերաբերյալ վարկածները հիմնված են սպեկտրասկոպիայի մեթոդների վրա, մասնավորապես հիմնված են գծային (ԳԴ) և շրջանային դիֆրոիզմների (ՇԴ) մեթոդներով հետազոտությունների արդյունքների վրա [55-58]: Սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի AT և GC զույգերի հետ կապվում է տարբեր եղանակներով, այնուամենայնիվ, այդ մեթոդները չեն բացատրում կապման տարբերությունները (նկ. 6) [58]:

Քանի որ ռենտգենաբյուրեղագրաֆիական և ՄՄՌ մեթոդները կիրառելի չեն ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսի հետազոտման համար, նպատակահարմար է հետազոտությունները իրականացնել կոմպլեքսների կառուցվածքային մոդելների վրա, որոնց միջոցով կարելի է նաև իրականացնել Էներգետիկ վերլուծություններ:

ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդի կապման մեխանիզմների մասին գոյություն ունեն տարբեր ենթադրություններ: Մասնավորապես, որոշ տվյալների համաձայն, ՄԿ-ի մոլեկուլները ներթափանցում են (ինտերկալյացիա) ազոտային հիմքերի հարթության միջև: Սակայն, տարբեր տվյալներ նաև ցույց են տալիս, որ ՄԿ-ի մոլեկուլները կարող են տեղակայվել ԴՆԹ-ի ինչպես փոքր, այնպես էլ մեծ ակոսում: Ինչպես ցույց են տալիս սպեկտրասկոպիկ տվյալները, ԴՆԹ-ի՝ GC հաջորդականություններով հարուստ հատվածների հետ ՄԿ-ը կապվում է ինտերկալյացիոն եղանակով, իսկ AT հաջորդականություններով հարուստ հատվածների դեպքում ՄԿ-ի հետերոցիկլիկ ատոմները տեղակայվում են փոքր ակոսում [58]:

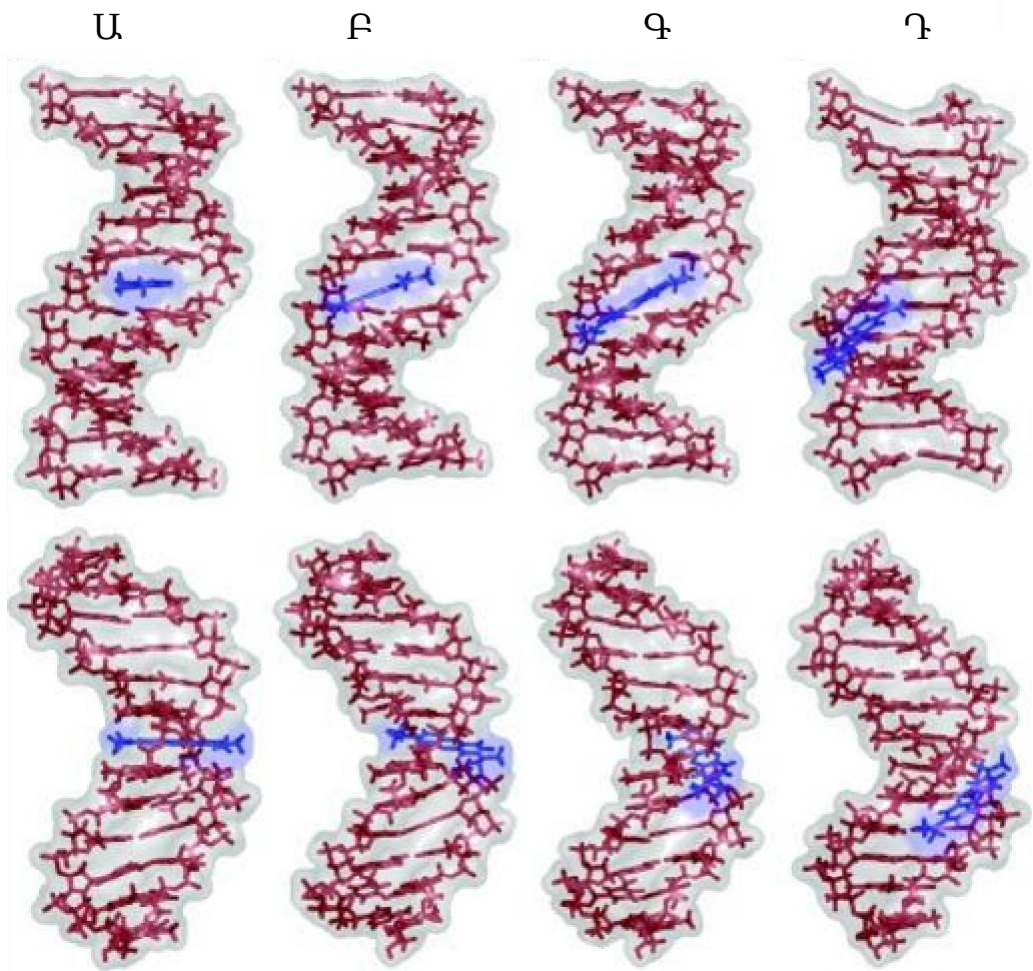
ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների էներգետիկ վերլուծությունը ևս ցույց է տվել, որ այդ լիզանդի մոլեկուլները ԴՆԹ-ի AT- գույգերով հարուստ հատվածների հետ նախընտրելիորեն կապվում են ոչ ինտերկալյացիոն եղանակով: Չնայած այն հանգամանքին, որ կապման այդ երկու մեխանիզմների էներգետիկ արժեքները միմյանցից չեն տարբերվում, ենթադրվում է, որ ՄԿ-ը տեղակայվում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: Հաշվարկների ժամանակ էնթալպիայի ներդրումն անտեսվել է, քանի որ էներգիայի հարաբերական արժեքը գնահատելիս այն կարելի է անտեսել: Ենթադրվում է, որ ՄԿ-ի նախընտրելիությունը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսի նկատմամբ պայմանավորված է վան-դեր-Վաալսյան փոխազդեցություններով [58]:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ՄԿ-ի միացումը ԴՆԹ-ի GC- հաջորդականություններ պարունակող դեկամերի հետ (նկ. 8) տեղի է ունենում ինտերկալյացիայի եղանակով, քանի որ այն էներգիապես ավելի արդյունավետ է: Կառուցվածքային մոդելների միջոցով իրականացված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ կարող են առաջանալ 6 տարբեր տիպի կոմպլեքսներ: ԴՆԹ-ի GC հարուստ տեղամասերում գոյություն ունեն  $ՄԿ-5-CpG-3'$  և  $ՄԿ-5'-GpC-3'$  ինտերկալյացիոն 2 տեղամասեր: Լիզանդը կարող է փոխազդել ԴՆԹ-ի հետ զուգահեռ կամ գոշ կողմնորոշմամբ:

Այսպիսով, գոյություն ունեն կառուցվածքային չորս մոդելներ ինտերկալյացիայի համար և ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների երկու տիպ՝ փոքր և մեծ ակոսների համար [59-63]: Էներգետիկ վերլուծությունը ցույց է տվել, որ էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունների դերը փոխվում է ԴՆԹ-ի տարբեր կոմպլեքսների առաջացման ժամանակ: ՇԴ մեթոդով ստացված տվյալների հիման վրա ենթադրվում է, որ ՄԿ-ի համար էներգիապես ավելի շահավետ է ԴՆԹ-ի GC-հարուստ տեղամասերի հետ կապվելը [58,59]:

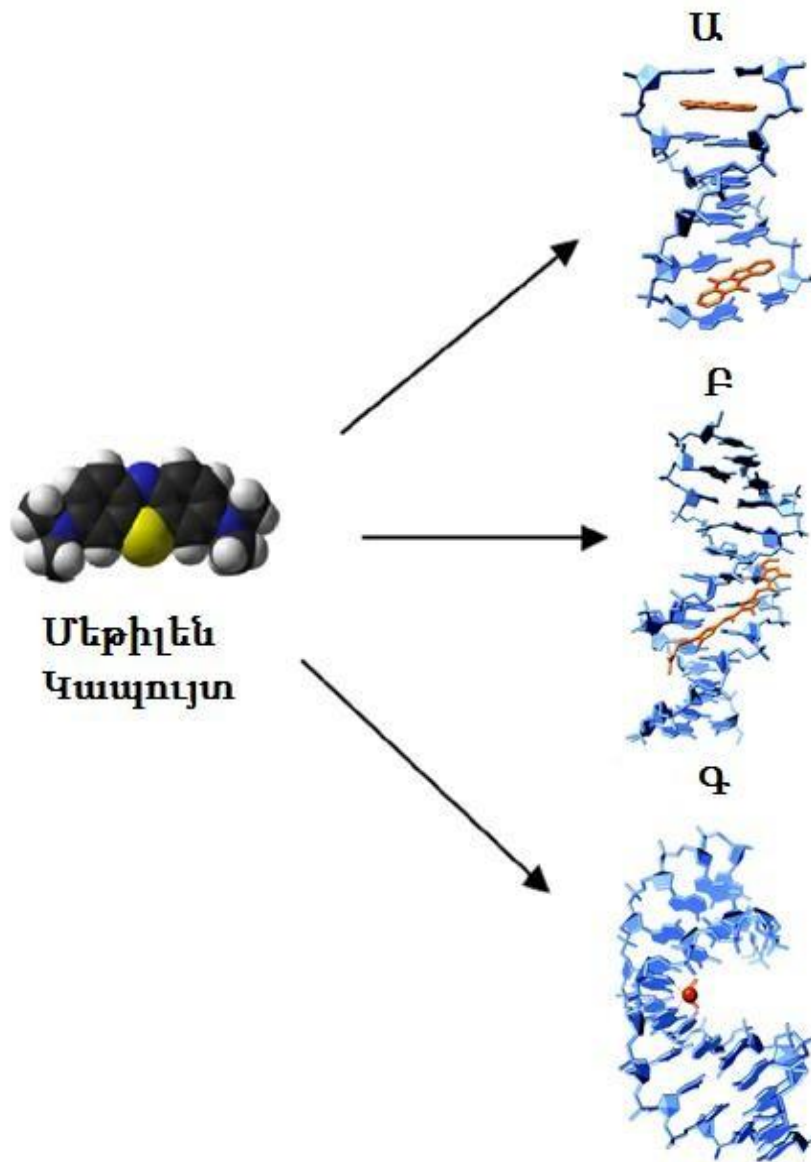
ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի ածանցյալ  $\beta$ -ցիկլոդեքստրինի կոմպլեքսների սպեկտրասկոպիկ և էլեկտրաքիմիական հետազոտություններից հետևում է, որ կապման հիմնական եղանակ է հանդիսանում էլեկտրաստատիկ մեխանիզմը: Սակայն ցույց է տրվել, որ լուծույթի փոքր իոնական ուժերի դեպքում ՄԿ-ը ինտերկալացվում է ԴՆԹ-ի հիմքերի հարթությունների միջև, մինչդեռ աղի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց ՄԿ-ն միաժամանակ կարող է կապվել նաև ԴՆԹ-ի արտաքին կողմում [55-58]:

Սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ՄԿ-ն ունի առավելագույն կլանում ալիքի  $\lambda=664$ նմ երկարության դեպքում, ընդ որում, նույն միջակայքում՝ 600-700նմ, գրանցվում է նաև ֆլուորեսցենցիա այդ լիզանդի կողմից, ինչը կարելի է բացատրել նրանով, որ գրգռված վիճակից հիմնական վիճակի անցման ընթացքում գրգռման էներգիան արձակվում է լույսի ձևով՝ գրեթե առանց ցրման: Ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը կախված է ոչ միայն ԴՆԹ-ում նուկլեոտիդային հաջորդականությունից, այլ նաև միջավայրից: Փորձարարական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման հաստատունը նվազում է լուծույթի իոնական ուժի մեծացման դեպքում [55-68]:



Նկար. 6. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման տարբեր մեխանիզմները:

Ա-ում և Բ-ում ներկայացված է ինտերկալյացիոն մեխանիզմը մեծ (վերևում) և փոքր (ներքևում) ալոսներում; Գ-ում և Դ-ում՝ ոչ ինտերկալյացիոն մեխանիզմով միացումը:



Նկար. 7. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման մեխանիզմները:  
 Ա-ինտերկալյացիա, Բ-ակոսային կապում, Գ-էլեկտրաստատիկ  
 փոխազդեցություն:

### 1.3. Պարույր-կծիկ փոխարկումը ԴՆԹ-ում

20-րդ դարի կեսերի կարևորագույն ձեռքբերումներից մեկը ԴՆԹ-ի երկպարույր կառուցվածքի հայտնաբերումն է: Ենթադրվում է, որ այդ կառուցվածքն առաջացել է, որպեսզի երկու շղթաների միացման միջոցով պաշտպանվի գենետիկական ինֆորմացիան, որը ամփոփված է ազոտային հիմքերի գույգերի հաջորդականություններում, որոնք հեռանում են իրարից՝ այդ տեղեկատվության իրացման ժամանակ: Հետևաբար, ԴՆԹ-ի շղթաների՝ իրարից հեռացման գործընթացը անմիջականորեն կապված է ԴՆԹ-ի գենետիկական ֆունկցիայի իրականացման հետ [69-78]: ԴՆԹ-ն կազմված է երկու պոլինուկլեոտիդային շղթաներից, որոնք պարուրված են միմյանց վրա և իրար հետ կապվում են հիմքերի գույգման հաշվին: Հիմքերի գույգը ձևավորվում է նուկլեոտիդների կազմի մեջ մտնող ազոտական հիմքերի միջև եղած ջրածնական կապերի հաշվին: Նուկլեինաթթուներում հանդիպում են 5 տիպի նուկլեոտիդներ՝ ադենին (A), գուանին (G), թիմին (T), ցիտոզին (C) և ուրացիլ (U), ընդ որում, ԴՆԹ-ում հանդիպում են A-ը, G-ը, T-ը և C-ը [4,70]:

Հիմքերի գույգը հանդիսանում է կառուցողական բլոկ, պայմանավորում է ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքը և բնական պայմաններում այդ գույգը կոչվում է Ուոթսոն-Կրիկյան (A-T-ի և G-C-ի միջև): ԴՆԹ-ի այդպիսի կազմավորումը հանգեցնում է կանոնավոր պարույրային կառուցվածքի՝ նուկլեոտիդային հաջորդականությունից անկախ: Հիմքերի գույգը ձևավորվում է լրացության սկզբունքով, որը կարևոր է գենետիկական ինֆորմացիայի՝ սերնդե սերունդ փոխանցման համար:

ԴՆԹ-ի կանոնավոր կառուցվածքը և նրանում կոդավորված տվյալների ավելցուկը ապահովում են գենետիկական ինֆորմացիայի պահպանումը, ինչպես նաև կրկնապատկումը ԴՆԹ-պոլիմերագով կամ այդ ինֆորմացիայի ընթերցումը ՌՆԹ-պոլիմերագով: Ավելին, սպեցիֆիկ հիմքերի գույգերը ճանաչվում են ԴՆԹ-ի հետ կապվող սպիտակուցներով, որն ընկած է գենային էքսպրեսիայի հիմքում [4]:

Միաշղթա նուկլեինաթթուներում (մշ-ՌՆԹ կամ ԴՆԹ) կարող են առաջանալ ներմոլեկուլային Ուոթսոն-Կրիկյան հիմքերի գույգեր, ինչի շնորհիվ ձևավորվում են կարճ երկշղթա պարույրներ կամ G-U և A-A տիպի ոչ Ուոթսոն-Կրիկյան գույգեր, ինչը թույլ է տալիս, որպեսզի ՌՆԹ-ն փաթեթավորվի եռաչափ կառուցվածքի տեսքով:

Լրացության սկզբունքն ընկած է նաև տրանսլյացիայի ժամանակ ի-ՌՆԹ-ի և փ-ՌՆԹ-ի միջև հիմքերի գույգի ձևավորման պրոցեսի հիմքում [77]:

Հիմքերի գույգում ջրածնի ատոմների դոնոր և ակցեպտոր խմբերի միջև երկրաչափական համապատասխանությունը պայմանավորում է նուկլեինաթթվի կայուն կառուցվածքը: G-C մեծ պարունակությամբ ԴՆԹ-ն ավելի կայուն է, քան A-T պարունակությամբ ԴՆԹ-ն: Սակայն, որքան էլ զարմանալի է, ջրածնական կապերը չեն հանդիսանում ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի կայունացուցիչներ: ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքը կայունացվում է ստեկինգի փոխազդեցությունների միջոցով [80]:

Սենյակային ջերմաստիճանում ԴՆԹ-ի դուպլեքսները համեմատաբար կայուն են, սակայն նրա շղթաները հեռանում են իրարից՝ ջերմաստիճանի բարձրացման դեպքում (հալում) [80-89]: Այդ գործընթացը նկարագրվում է հալման ջերմաստիճանով՝  $T_m$ -ով, որը կախված է մոլեկուլի երկարությունից, սխալ գույգված տեղամասերի (եթե այդպիսիք առկա են) երկարությունից և միջին G-C պարունակությունից [90-97]: GC բարձր պարունակությամբ է պայմանավորված հալման ջերմաստիճանի մեծ արժեքը: Դրանով է բացատրվում այն փաստը, որ ջերմասեր օրգանիզմներում, օրինակ՝ *Thermus thermophilus*-ում, ԴՆԹ-ն շատ հարուստ է G-C հաջորդականություններով: Նմանապես, գենոմի տրանսլյացիոն ակտիվ հատվածներում (օրինակ՝ պրոմոտորներում) G-C գույգերը առկա են աննշան թվով [80-88]:

ԴՆԹ-ի դենատուրացման (հալման) ժամանակ ձևավորվում են միաշղթա թելիկներ, քանի որ հիմքերի միջև հիդրոֆոբ ստեկինգ փոխազդեցությունները խախտվում են: Այդ գործընթացը կարելի է օգտագործել՝ ԴՆԹ-ի կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ կազմավորման որոշ տեսանկյուններ վերլուծելու համար. հալման ջերմաստիճանի մեծ արժեքը հանդիսանում է ԴՆԹ-ում միջին GC պարունակության մեծ քանակության արդյունք, ինչը թույլ է տալիս որոշել նուկլեոտիդային հաջորդականությունների տարբերությունները՝ տարբեր աղբյուրներից ստացված ԴՆԹ-ի միջև [70]: Դենատուրացված ԴՆԹ-ն, սառեցումից հետո, կարող է ռենատուրացվել՝ երկու շղթաների միջև եղած լրացչության շնորհիվ: Երկու տարբեր ԴՆԹ-երի առկայության դեպքում կարող են ձևավորել հիբրիդային մոլեկուլներ, եթե այդ ԴՆԹ-ներում կան իրար համապատասխանող հաջորդականություններ: Դրա հիման վրա կարելի է որոշել տարբեր տեսակների միջև գենետիկական հեռավորությունը: Ժելի



գրադիենտում դենատուրացված ԴՆԹ-ի առանձին հատվածների մեկուսացման միջոցով կարելի է սևեռել զույգման գործընթացում առաջացող կետային սխալները [69-88]:

### 1.3.1 ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցման թերմոդինամիկան

ԴՆԹ-ի թերմոդինամիկ կայունությունը հիմնականում պայմանավորված է առանձին պոլինուկլեոտիդային շղթաների և դրանց զույգման դեպքում երկշղթա պարույրի միջև եղած ազատ էներգիայի արժեքների տարբերությամբ:

ԴՆԹ-ի տվյալ կոնֆորմացիայի թերմոդինամիկ վիճակի չափվող ֆունկցիաներն են  $\Delta G$ -ն (ազատ էներգիայի փոփոխությունը, որը սովորաբար որոշվում է  $\Delta G = -RT \ln K$  բանաձևով),  $\Delta H$ -ը (էնթալպիայի փոփոխությունը) և  $\Delta S$ -ը (էնթալպիայի փոփոխությունը):  $\Delta S$ -ը որոշվում է Գիբսի ստանդարտ հավասարումից [53].

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Կոմպակտ, համեմատաբար պինդ վիճակից անցումը հեղուկ, առավել ճկուն վիճակի կապված է էնթալպիայի փոփոխության աճի հետ: Այդ տեսանկյունից կարելի էր ակնկալել, որ լուծված ԴՆԹ-ն պետք է ունենա ներքին էներգիայի մեծ, բացասական արժեք, քանի որ բոլոր ատոմ-ատոմային փոխազդեցությունները օպտիմալացված են և ոչ մի կապ խախտված չէ [98-108]: Այնուամենայնիվ, ԴՆԹ-ի մոլեկուլի երկարաձգված կառուցվածքի պատճառով նպատակահարմար փոխազդեցությունների մեծ մասը վերանում է, որի հետևանքով մեծանում է ներքին էներգիայի ( $\Delta U > 0$ ) արժեքը: Ավելին, ԴՆԹ-ն լուծույթում գտնվում է հիդրատացված վիճակում, ինչը լրացուցիչ ներդրում ունի ազատ էներգիայի փոփոխության արժեքում, քանի որ դա պայմանավորված է առանձին շղթաներից երկշղթա կառուցվածքի առաջացման ժամանակ միջմոլեկուլային կապերի և ջրի մոլեկուլների հետ փոխազդեցության էներգիաների տարբերությամբ: Փաստացի,  $\Delta H$ -ի փոփոխության որոշումը դառնում է հիմնարար՝ ԴՆԹ-ի տվյալ կառուցվածքի կայունությունը և լիզանդների հետ փոխազդեցությունները հասկանալու համար [109-113]: Ջերմաստիճանից կախված պարույր-կծիկ անցման ազատ էներգիայի փոփոխությունը որոշվում է հետևյալ հավասարումով.

$$d(\Delta G) / dT = -\Delta S \quad (2)$$

իսկ ջերմաստիճանի աճին զուգընթաց հավասարակշռության հաստատունի արժեքը մեծանում է ըստ հետևյալ հավասարման.

$$dK / dT = K \cdot \Delta H / RT^2 \quad (3)$$

Փորձարարականորեն ցույց է տրվել, որ պոլինուկլեոտիդները հալվում են մեծ կոոպերատիվությամբ (այսինքն՝ միջանկյալ վիճակների հավասարակշռության կոնցենտրացիաները աննշան են), իսկ  $\Delta H$ -ն ունի դրական մեծ արժեք, քանի որ կրկնակի և եռակի պարույրների հալման համար անհրաժեշտ է մեծ ջերմություն [98-108]: Հալման ջերմաստիճանը (երբ պարույրում նատիվ և դենատուրացված հատվածների բաժնեմասերը հավասար են) աճում է լուծույթի իոնական ուժի և GC միջին պարունակության մեծացման դեպքում և գրեթե կախված չէ pH-ի փոփոխությունից  $4,0 \leq pH \leq 9,0$  միջակայքում: Քանի որ նուկլեինաթթուներն ունեն հիդրատացման բարձր աստիճան, դրա հետ մեկտեղ ջրի հետ փոխազդեցությունները պարույր և կծիկ վիճակներում միանման չեն, ուստի երկշղթա կառուցվածքի հավասարակշռության վիճակը կախված է նաև ջրի ակտիվությունից, ինչը նույնպես պետք է հաշվի առնել ազատ էներգիայի որոշման ժամանակ: Ի տարբերություն պոլինուկլեոտիդների, օլիգոնուկլեոտիդների  $T_m$ -ը զգալիորեն կախված է վերջիններիս կոնցենտրացիայից, քանի որ տվյալ դեպքում  $\Delta H$ -ի կախվածությունը հիմքերի զույգերից գծային ֆունկցիա է [113-120]:

Օլիգոնուկլեոտիդների հալման ջերմաստիճանն ավելի փոքր է, քան պոլինուկլեոտիդներինը: Վերջնական վիճակում միաշղթա օլիգոնուկլեոտիդների մոտ մասնակիորեն պահպանվում են ստեկինգ փոխազդեցությունները, որոնք խախտվում են ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց:

Այդ տեսանկյունից, օլիգոնուկլեոտիդների հալման ջերմաստիճանից ավելի ցածր և բարձր ջերմաստիճաններում տեղի ունեցող և պարույր-կծիկ անցումը նկարագրող կորերը, ինչպես և սպասվում էր, հարթ չեն. դրանց թեքությունը կախված է հիմքերի հաջորդականություններից և դժվար է դրանց արտարկել պոլինուկլեոտիդների դեպքի համար [121-129]:

$T_m$ -ի որոշման համար օգտագործում են տարբեր բանաձևեր, որոնցից մի քանիսը թույլ են տալիս այս պարամետրը որոշել մեծ ճշգրտությամբ [130-136]:

Օլիգոնուկլեոտիդների և ԴՆԹ-ի կարճ հատվածների դեպքում երկու շղթաների հիբրիդացման թերմոդինամիկան իրենից ներկայացնում է երկու փուլերից բաղկացած գործընթաց, որի ընթացքում կարելի է անտեսել երկու շղթաների միջև առաջացող միջանկյալ ձևերը: Այս մոտեցումը հնարավորություն է ընձեռում որոշելու երկշղթա կառուցվածքի առաջացման թերմոդինամիկ պարամետրերը, եթե վերջինս պատկերացնենք որպես A և B վիճակներից անցում AB վիճակի [135]:



Այդ դեպքում հավասարակշռության հաստատունը որոշվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$K = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (5)$$

Ըստ Վանտ-Հոֆֆի հավասարման, այդ պրոցեսի ազատ էներգիայի փոփոխությունը՝  $\Delta G^\circ$ -ն որոշվում է ըստ հետևյալ արտահայտության.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (6)$$

որտեղ  $R$ -ը գազային ունիվերսալ հաստատունն է,  $K$ -ն՝ հավասարակշռության հաստատունը,  $T$ -ն՝ բացարձակ ջերմաստիճանը: Տեղադրելով (5)-ը (6)-ում, ստացվում է

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (7)$$

$T_m$ -ը այն ջերմաստիճանն է, որի դեպքում ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի կեսը գտնվում է հալված վիճակում, հետևաբար,  $T_m$  ջերմաստիճանում [A]-ն, [B]-ն և [AB]-ն հավասար քանակներով են, որը համապատասխանում է հրահրված երկշղթա կառուցվածքի կեսին՝  $[AB]_{\text{հրահր.}}$ : Այսպիսով, հալման ջերմաստիճանը կարելի է որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$T_m = -\frac{\Delta G^\circ}{R \ln \frac{[AB]_{\text{initial}}}{2}} \quad (8)$$

Քանի որ  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ , ուստի  $T_m$ -ը կարելի է ներկայացնել հետևյալ տեսքով.

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ - R \ln \frac{[AB]_{\text{initial}}}{2}} \quad (9)$$

որտեղ  $\Delta H^\circ$ -ը և  $\Delta S^\circ$ -ը սովորաբար տրվում են միացման պրոցեսի համար (երկշղթա կառուցվածքի առաջացում): (9)-ը ձևափոխվում է հետևյալ կերպ [135].

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ + R \ln([A]_{total} - [B]_{total}/2)} \quad (10)$$

որտեղ  $[B]_{\text{ընդհանուր}} < [A]_{\text{ընդհանուր}}$ : Այս հավասարումը ճիշտ է, եթե ընդունենք, որ գոյություն ունեն միայն երկու վիճակներ՝ երկշղթա կառուցվածք և միաշղթա “պատահական” կծիկներ: Սակայն նուկլեինաթթուների հալման գործընթացը իրականանում է մի քանի միջանկյալ փուլերի առկայությամբ, հետևաբար, անհրաժեշտ է կիրառել մեխանիկական վիճակագրության մեթոդները, ինչը հատկապես կիրառելի է երկար հաջորդականություններից կազմված շղթաների համար [135]:

Այնուամենայնիվ, վերը նշված մոտեցումից ակնհայտ է, որ հալման ջերմաստիճանը և ջերմահրահրված պարույր-կծիկ անցման թերմոդինամիկ պարամետրերը գտնում են համապատասխանության մեջ, և  $T_m$ -ի միջոցով կարելի է որոշել  $\Delta G^\circ$ -ն կամ  $\Delta H^\circ$ -ը և  $\Delta S^\circ$ -ը: Եվ ընդհակառակը, կարևոր են նաև այն մոտեցումները, երբ կոնկրետ հաջորդականությունների համար հայտնի են այս պարամետրերը, և դրանց միջոցով կարելի է ստանալ  $T_m$ -ի արժեքը:

Դա իր հերթին թույլ է տալիս մոտարկել այս պարամետրերը մոտակա հարևանների մոդելի միջոցով: Մոդելի էությունը կայանում է հետևյալում. հակադիր շղթաների հիմքերի միջև փոխազդեցությունը կախված է շղթայի երկայնքով դրանց ամենամոտ հարևան հիմքերից: Եթե ԴՆԹ-ի պարույրը պատկերացնենք որպես լար, որում հիմքերի միջև առկա է փոխազդեցություն, ապա ըստ ամենամոտ հարևանների մոդելի ԴՆԹ-ի պարույրը իրենից կներկայացնի հարևան հիմքերի գույգերի միջև փոխազդեցություններից կազմված շղթա [135]:

Օրինակ՝ ԴՆԹ-ի հատվածի համար հետևյալ գծապատկերում ցույց է տրված հարևան հիմքերի միջև փոխազդեցությունը.

↓↓↓↓

5' C-G-T-T-G-A 3'

3' G-C-A-A-C-T 5'

ԴՆԹ-ի առանձին շղթաներից տվյալ հատվածի առաջացման համար անհրաժեշտ ազատ էներգիան 37°C ջերմաստիճանում կարելի է ներկայացնել հետևյալ արտահայտությամբ [103].

$$\Delta G_{37} = \Delta G_{37}(\text{CG հրահրված}) + \Delta G_{37}(\text{CG/GC}) + \Delta G_{37}(\text{GT/CA}) + \Delta G_{37}(\text{TT/AA}) + \Delta G_{37}(\text{TG/AC}) + \Delta G_{37}(\text{GA/CT}) + \Delta G_{37}(\text{AT հրահրված})$$

որտեղ առաջին բաղադրիչը CG հիմքերի զույգի ազատ էներգիան է ամենամոտ հարևանների բացակայության դեպքում, երկրորդ բաղադրիչը երկրորդ CG զույգի առաջացման և այդ երկու զույգերի միջև ստեկինգի ազատ էներգիան է: Հաջորդ բաղադրիչը համանման է նախորդներին: Այսպիսով, երկշղթա նուկլեինաթթվի առաջացման ընդհանուր ազատ էներգիան կարելի է ներկայացնել հետևյալ արտահայտությամբ [135].

$$\Delta G_{37}(\text{ÁY' Ñ' Ýáñ}) = \Delta G_{37}(\text{Ññ}^3 \text{ Í}) + \sum_{i=1}^{\text{Ñ}} n_i \Delta G_{37}(i) \quad (11)$$

$\Delta G^\circ$ -ի յուրաքանչյուր բաղադրիչ ունի  $\Delta H^\circ$ -ի և  $\Delta S^\circ$ -ի իր բաղադրիչները, հետևաբար, ազատ էներգիայի փոփոխությունը կարելի է ներկայացնել հետևյալ արտահայտությամբ.

$$\Delta G^\circ(\text{ÁY' Ñ' Ýáñ}) = \Delta H_{\text{ÁY' Ñ' Ýáñ}}^\circ - T \Delta S_{\text{ÁY' Ñ' Ýáñ}}^\circ \quad (12)$$

$\Delta H^\circ$ -ի և  $\Delta S^\circ$ -ի արժեքները որոշվել են զույգերի միջև 10 հնարավոր համակցումների համար: 37°C ջերմաստիճանում ստացված տվյալները բերված են աղյուսակ 1-ում: Այս արժեքներն օգտագործելով՝ ստացվել է  $\Delta G_{37}^\circ$ -ի արժեքը, որը հավասար է 22.4 կՋ/մոլ, ինչը գործնականում համընկնում է փորձարարականորեն ստացված -21.8 կՋ/մոլ արժեքի հետ: Աղյուսակ 1-ում բերված տվյալները ստացվել են  $T_m$ -ից՝ կարճ օլիգոնուկլոտիդային դուպլեքսների 10 տարբեր համակցումների համար: Հետաքրքիր է, որ դրանցից ութը անկախ են: Ամենամոտ հարևանների մոդելը կարելի է կիրառել նաև ոչ Ուոթսոն-Կրիկյան զույգերի համար՝ դրանց, ինչպես նաև դրանց և Ուոթսոն-Կրիկյան զույգերի միջև փոխազդեցության պարամետրերի ներառման համար [135,136]:

1 M NaCl-ում, երկշղթա ԴՆԹ-ի համար ամենամոտ հարևանների մոդելի միջոցով ստացված թերմոդինամիկ պարամետրերի արժեքները

Հաջորդականությունների ամենամոտ հարևանները (5'-3')/(3'-5')	$\Delta H^\circ$ ; կՋ/մոլ	$\Delta S^\circ$ ; Ջ/մոլ ·K	$\Delta G^\circ_{37}$ ; կՋ/մոլ
AA/TT	-33.1	-92.9	-4.26
AT/TA	-30.1	-85.4	-3.67
TA/AT	-30.1	-89.1	-2.50
CA/GT	-35.6	-95.0	-6.12
GT/CA	-35.1	-93.7	-6.09
CT/GA	-32.6	-87.9	-5.40
GA/CT	-34.3	-92.9	-5.51
CG/GC	-44.4	-113.8	-9.07
GC/CG	-41.0	-102.1	-9.36
GG/CC	-33.5	-83.3	-7.66
ծայրային A-T զույգ	9.6	17.2	4.31
ծայրային G-C զույգ	0.4	-11.7	4.05

Դա թույլ է տալիս գնահատել հետևյալ մեկուսացված (կետային) սխալներ պարունակող հաջորդականությունների թերմոդինամիկ պարամետրերը.

↓↓↓

5' G-G-A-C-T-G-A-C-G 3'

3' C-C-T-G-G-C-T-G-C 5'

Այդ պարամետրերը ստացվել են ԴՆԹ-ի հալման փորձերի հիման վրա և ամփոփվել են աղյուսակ 1-ում: Նուկլեինաթթուների հալման առավել ճշգրիտ մոդելավորումը հնարավոր է, եթե ստացված են ԴՆԹ-ի երկու շղթաների հարևան խմբերի միջև փոխազդեցությունների պարամետրերը, սակայն, դրա համար անհրաժեշտ է հաշվի առնել "TCG/AGC" տրիպլետների միջև փոխազդեցությունները: Ընդ որում, գոյություն ունեն 32 տիպի հպումներ: Այնուամենայնիվ, քանի որ ամենամոտ հարևանների առաջարկվող մոդելը մեծ համապատասխանության մեջ է փորձարարականորեն ստացված արդյունքների հետ, լրացուցիչ ուսումնասիրությունների անհրաժեշտությունը վերանում է:

## Գլուխ 2

### ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

#### 2.1 Օգտագործված նյութեր և սարքեր

**Պրեպարատներ:** Աշխատանքում օգտագործվել են հորթի ուրցագեղձից՝ միջին GC պարունակությունը՝ 42%, Clostridium Perfringens (Cl. perfr.) - 32 %, Micrococcus Lysodeikticus (M. lysod.)՝ - 72 % անջատված ԴՆԹ, “Sigma” (ԱՄՆ), մեթիլեն կապույտ՝ ՄԿ “Aldrich” (ԱՄՆ), Hoechst 33258, “Aldrich” (ԱՄՆ), էթիդիումի բրոմիդ՝ ԷԲ, “Serva” (Գերմանիա), NaCl, նատրիումի ցիտրատ:

Բոլոր պրեպարատները օգտագործվել են առանց լրացուցիչ մաքրման: Օգտագործված պրեպարատների կոնցենտրացիաները որոշվել են կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդով, ըստ մարման մոլային հետևյալ գործակիցների.  $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{սմ}^{-1}$  հորթի ուրցագեղձի և M. lysod. ԴՆԹ-ի,  $\epsilon_{260}=7400 \text{ M}^{-1}\text{սմ}^{-1}$  Cl. perfr. ԴՆԹ-ի,  $\epsilon_{664}=76000 \text{ M}^{-1}\text{սմ}^{-1}$  ՄԿ-ի,  $\epsilon_{342}=42000 \text{ M}^{-1}\text{սմ}^{-1}$  H33258-ի և  $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{սմ}^{-1}$  ԷԲ-ի համար:

Ուսումնասիրությունները կատարվել են լուծույթի 0,002 և 0,02 M իոնական ուժերի պայմաններում:

**Սարքեր:** Սպեկտրոսկոպիկ չափումներն իրականացվել են UV VIS Spectrophotometer Specord 50 Analytik Jena (Գերմանիա), Unicam SP8-100 (Անգլիա) սպեկտրոֆոտոմետրերի միջոցով: Ֆյուորեսցենցիայի սպեկտրները գրանցվել են Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Ավստրալիա) սպեկտրոֆլուորիմետրի միջոցով:

Օգտագործվել են կվարցե կյուվետներ (ծավալը՝ 3 մլ, օպտիկական ճանապարհի երկարությունը՝ 1 սմ): Ուսումնասարվող լուծույթների տիտրումն իրականացվել է 10 $\mu$ լ ծավալով միկրոկայթոցիկով, “Hamilton” (ԱՄՆ):

#### 2.2. ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների պատրաստումը

Կլանման սպեկտրների ստացման համար լուծույթում ՄԿ-ի կոնցենտրացիան մնացել է հաստատուն, իսկ ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան աճել է տիտրման արդյունքում այնպես, որ ԴՆԹ/ՄԿ կոնցենտրացիոն հարաբերությունը փոփոխվել է 0-ից մինչև ԴՆԹ/ՄԿ $\approx$ 10 արժեքները: Կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները գրանցվել են ալիքի երկարության



220 ≤ λ ≤ 750 նմ փոփոխության միջակայքում: ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց կլանման սպեկտրներում ի հայտ է եկել իզոբեստիկ կետ λ=670 նմ-ի տակ, որը վկայում է այն մասին, որ ՄԿ-ի մոլեկուլները լուծույթում գտնվում են ազատ և կապված վիճակներում, սակայն ցուցաբերում են միևնույն կլանումը: ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիաների որոշակի արժեքներից սկսած ՄԿ-ի բոլոր մոլեկուլներն անցնում են լրիվ կապված վիճակի և դրանց համապատասխանող կլանման սպեկտրներն այլևս չեն անցնում իզոբեստիկ կետով:

### 2.3 Կապման կորերի կառուցումը Սկետչարդի կոորդինատներով

Լիզանդների հետ մակրոմոլեկուլների (ԴՆԹ, ՌՆԹ) փոխազդեցություններին նվիրված են մեծաքանակ տեսական [137-139] և փորձարարական [69] աշխատանքներ:

Մակրոմոլեկուլների վրա լիզանդների ադսորբցիայի փորձնականորեն ստացված տվյալների վերլուծության համար կարևոր է այնպիսի վիճակի հասնելը, երբ մակրոմոլեկուլի վրա առկա կապման բոլոր տեղամասերը զբաղեցված են լիզանդի կողմից: Այնուամենայնիվ, երբեմն մակրոմոլեկուլի հետ լիզանդի թույլ միացման պատճառով չի հաջողվում հասնել լրիվ կապված վիճակի [137]:

Նշենք նաև, որ լիզանդի մոլեկուլներով լրիվ հագեցման համար պահանջվում են մակրոմոլեկուլի մեծ քանակություններ: Այդ պատճառով նպատակահարմար է միացման իզոթերմի միջոցով կապման պարամետրերը գնահատել կորի փոքր հագեցումներին համապատասխանող հատվածների տիրույթում:

Այս տեսակետից, աշխատանքներ [140,141]-ում ստացվել են մակրոմոլեկուլների վրա լիզանդների ադսորբցիայի իզոթերմեր՝ փոքր հագեցումների դեպքի համար.

$$r/C_f = K \frac{1-nr}{1-(n-1)r} \left[ \frac{1-nr}{1-(n-1)r} \right]^{n-1} \quad (13)$$

Ադսորբցիայի պրոցեսը դիտարկվում է որպես մակրոմոլեկուլի ազատ տեղամասի վրա լուծույթից լիզանդի ազատ մոլեկուլի անցման քվազիքիմիական ռեակցիա:

Այդ դեպքում մակրոմոլեկուլը նկարագրվում է որպես միաչափ բյուրեղ, որի վրա առկա են N թվով կապման տեղամասեր, իսկ լիզանդը ներկայացվում է որպես փոքր

զծային չափեր ունեցող և մակրոմոլեկուլի վրա  $n$  տեղամաս զբաղեցնող մոլեկուլ: [140,141]-ում ստացված իզոթերմերը փոքր հազեցվածության դեպքում կարող են զծայնացվել հետևյալ արտահայտության միջոցով.

$$\frac{r}{c_f} = K(1 - (2n - 1)r) \quad (14)$$

որտեղ  $r$ -ը լիզանդի՝ մակրոմոլեկուլի հետ կապված մոլեկուլների թիվն է,  $c_f$ -ը լիզանդի չկապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան է լուծույթում,  $n$ -ը տվյալ եղանակով կապման տեղերի թիվն է,  $K$ -ն՝ կապման հաստատունը: Փորձարարական տվյալների վերլուծությունը (14)-ով թույլ է տալիս մեծ ճշգրտությամբ ստանալու  $K$ -ի և  $n$ -ի արժեքները:

Ակնհայտ է, որ (14)-ի միջոցով  $K$ -ի և  $n$ -ի արժեքների որոշումը համեմատաբար դյուրին է, քիչ աշխատատար, բացի այդ, լիզանդի և մակրոմոլեկուլի մեծ քանակությունների անհրաժեշտություն չի առաջանում:

ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներից  $r/C_f$ -ի և  $r$ -ի ստացման համար որոշվել է լիզանդի ազատ մոլեկուլների կոնցենտրացիան՝  $C_f$ -ը ըստ հետևյալ հավասարման.

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \quad (15)$$

որտեղ  $A$ -ն ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների կլանումն է,  $A_0$ -ն և  $A_\infty$ -ը համապատասխանաբար լիզանդի լրիվ ազատ և լրիվ կապված վիճակում գտնվող մոլեկուլների կլանումներն են է,  $C_0$ -ն լիզանդի լրիվ կոնցենտրացիան է լուծույթում՝  $C_0 = C_f + C_b$ , որտեղ  $C_b$ -ն լիզանդի կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան է,  $r = C_b/C_p$ ,  $C_p$ -ն՝ նուկլեինաթթվի ֆոսֆատային խմբերի կոնցենտրացիան է:

#### 2.4. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապված մոլեկուլների քանակական որոշման ֆլուորեսցենտային մեթոդը

Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության չափումների համար օգտագործված լուծույթները պատրաստվել են նույն եղանակով, ինչպես կլանման սպեկտրների

չափումների դեպքում: ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները գրանցվել են ալիքի երկարության փոփոխության 300-750 նմ միջակայքում, 290 նմ երկարության զրգուման ալիքի դեպքում:

Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներից լիզանդի կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան հաշվարկել է ըստ հետևյալ հավասարումների.

$$C_F = C_0 \left( \frac{I}{I_0} - q \right) / (1 - q) \quad (15)$$

$$C_B = C_0 - C_F \quad (16)$$

$$\frac{r}{C_F} = Kn - Kr \quad (17)$$

որտեղ  $C_F$ -ը ՄԿ-ի ազատ մոլեկուլների կոնցենտրացիան է,  $C_0$ -ն ՄԿ-ի ընդհանուր կոնցենտրացիան է,  $C_B$ -ն՝ ՄԿ-ի կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան:  $q$ -ն ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի գումարային քվանտային ելքի հարաբերությունն է լիզանդի ազատ մոլեկուլների քվանտային ելքին,  $I_0$ -ն՝ ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիան է լուծույթում ԴՆԹ-ի բացակայության պայմաններում,  $I$ -ն՝ ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիան է լուծույթում ԴՆԹ-ի առկայության պայմաններում,  $r$ -ը՝ ԴՆԹ-ի հետ լիզանդի կապված մոլեկուլների թիվն է,  $r = \text{ՄԿ} / [\text{ԴՆԹ}]$ ,  $K$ -ն՝ կապման հաստատունն է,  $n$ -ը՝ կապման տեղամասերի թիվը:  $q$ -ն որոշվել է ՄԿ-ի հայտնի կոնցենտրացիայով լուծույթին ԴՆԹ-ի ավելացմամբ, մինչև ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխության ի հայտ գալը:  $q$ -ն որոշվում է  $I/I_0 -$  ի՝  $1/[\text{ԴՆԹ}]$ -ից գծային կախվածության միջոցով:

## 2.5. ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների որոշման ֆլուորիմետրիկ մեթոդը

Ֆլուորեսցենտային սպեկտրներից ինտերկալյացիոն եղանակով ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան որոշվել է հետևյալ հավասարումից.

$$\frac{c^{\Phi}(t)}{c} = \frac{[I(t) - I(t)]}{I(t)} = \frac{k}{1} t \quad (19)$$

որտեղ  $I(t)$  –ն ԴՆԹ/ԷԲ որոշակի հարաբերությամբ կոմպլեքսների,  $I_1(t)$ -ն  $I_2(t)$ -ն՝ համապատասխանաբար ԷԲ-ի լրիվ ազատ և լրիվ կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություններն են: ԷԲ-ի մոլեկուլների գրգռումն իրականացվել է  $\lambda_{գրգռ.}=510$  նմ ալիքի երկարության տակ, ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումները գրանցվել են  $\lambda_{ֆլ.}=610$  նմ-ի տակ:

ԷԲ-ի ընդհանուր կոնցենտրացիան լուծույթում՝  $C_0=C_1+C_2$ , որտեղ  $C_1$ -ը ԷԲ-ի ազատ, մոլեկուլների կոնցենտրացիան է և որոշվել է ըստ կլանման սպեկտրների,  $C_2$ -ը լուծույթում ԷԲ-ի կապված վիճակում գտնվող մոլեկուլների գումարային կոնցենտրացիան է և իրենից ներկայացնում է  $C_2=C_2^{\Phi}+C_2^{2\Phi}$ , որտեղ  $C_2^{\Phi}$ -ը՝ ԷԲ-ի կապված և հետլուսարձակող մոլեկուլների կոնցենտրացիան է,  $C_2^{2\Phi}$ -ն՝ կապված և հետլուսարձակում չունեցող (չֆլուորեսցենցող) մոլեկուլների կոնցենտրացիան է,  $r_{\Phi}=C_2^{\Phi}/C_p$ ,  $r^{2\Phi}=C_2^{2\Phi}/C_p$ ,  $r=r^{\Phi}+r^{2\Phi}$ , որտեղ  $C_p$ -ն ԴՆԹ-ի ֆոսֆատային խմբերի կոնցենտրացիան է:

## 2.6. ԴՆԹ-ի և ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման ուսումնասիրությունը հալման մեթոդով

Ֆիզիոլոգիական պայմաններում, այսինքն՝ pH-ի չեզոք արժեքի դեպքում, չափավոր իոնական ուժերով լուծույթներում և սենյակային ջերմաստիճանում ԴՆԹ-ն գտնվում է երկշղթա վիճակում: Ջերմաստիճանի բարձրացման կամ դեպի հիմնային կամ թթվային արժեքների կողմը pH-ի շեղման, ինչպես նաև տարբեր նյութերի առկայության դեպքում տեղի է ունենում պարույր-կծիկ անցում, որի արդյունքում ԴՆԹ-ն երկշղթա պարույրային վիճակից անցնում է միաշղթա կծիկային վիճակի: Այս անցումը կարելի է ուսումնասիրել տարբեր մեթոդներով, որոնցից առավել տեղեկատվական է կլանման սպեկտրասկոպիան ուլտրամանուշակագույն (ՈւՄ) տիրույթում:

Դա պայմանավորված է նրանով, որ պարույր-կծիկ անցման արդյունքում տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի կլանման մաքսիմումի փոփոխություն: Սովորաբար, հալման կորը կառուցելու նպատակով որոշվում է տվյալ ջերմաստիճանում մոլեկուլի հալված հիմքերի զույգերի բաժնեմասը՝ 1-9, որը կապված է ՈւՄ-կլանման հետ հետևյալ առնչությամբ՝

$$1 - \mathcal{G} = \frac{A_i - A_{a, \hat{n}}}{A_{ij} - A_{a, \hat{n}}} \quad (20)$$

որտեղ  $A_{այսր}$ -ը և  $A_{կծ}$ -ը համապատասխանաբար ԴՆԹ-ի լրիվ պարույրային և լրիվ կծիկաձև վիճակների օպտիկական կլանումներն են,  $A$ -ն կլանումն է տվյալ ջերմաստիճանում: Հալման կորը բնութագրվում է հետևյալ երկու պարամետրերով՝  $T_m$  հալման ջերմաստիճանով և հալման միջակայքի լայնությամբ՝  $\Delta T$ -ով:  $T_m$ -ը համապատասխանում է այն ջերմաստիճանին, որի դեպքում ԴՆԹ-ի մոլեկուլի 50%-ը գտնվում է հալված վիճակում (հարթ կորերի դեպքում), իսկ  $\Delta T$ -ն ջերմաստիճանային այն միջակայքն է, որը ստացվում է, երբ հալման ջերմաստիճանով անցկացվում է շոշափող, որը հալման կորի հետ հատվում է  $1 - \mathcal{G} = 0$  և  $1 - \mathcal{G} = 1$  կետերին համապատասխանող ջերմաստիճաններում:

$$\Delta T = \left( \frac{\partial \mathcal{G}}{\partial T} \right)_{T=T_m}^{-1} \quad (21)$$

ԴՆԹ-ի հալումը դարձելի պրոցես է և որոշակի պայմաններում կարելի է հասնել երկու շղթաների ամբողջական գույզմանը: Այս պրոցեսը կոչվում է ռենատուրացիա և այն լայնորեն կիրառվում է բազմաթիվ հետազոտություններում: ԴՆԹ-ի և լիզանդների հետ դրա կոմպլեքսների ջերմահրահրված պարույր-կծիկ անցումը իրականացվել է տեֆլոնե խցաններով հերմետիկ փակվող կվարցե կյուվետներում: Այդ պայմաններում զանգվածի փոփոխություն տեղի չի ունենում: Ջերմաստիճանը փոփոխվել է անմիջապես կյուվետում՝ պլատինային ռեզիստորի օգնությամբ (փորձերն իրականացվել են Pye UNICAM-SP8-100 սարքով): Հալման կորերը կառուցվել են 260 նմ ալիքի երկարության տակ, ջերմաստիճանից կախված, նմուշների կլանման փոփոխության հիման վրա:

### ԳԼՈՒԽ 3

#### ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

##### 3.1. LabView միջավայրում մշակված ծրագրային ապահովում սպեկտրոֆոտոմետրիկ հետազոտությունների համար

Սպեկտրաֆոտոմետրիկ և կինետիկ հետազոտությունների տեղեկատվության ճշգրտությունը կախված է ոչ միայն օգտագործվող միացությունների մաքրության աստիճանից, այլև գրանցող սարքի զգայունությունից և սպեկտրալ և ջերմաստիճանային չափումներից: Նմանատիպ սարքավորումների նկատմամբ պահանջները կարելի է բաժանել հետևյալ հիմնական խմբերի. սպեկտրալ զգայունություն, ջերմաստիճանի փոփոխման և գրանցման ճշգրտություն, վերը նշված պարամետրերի գրանցման ճշգրտություն:

Հարկ է նշել, որ կլանման փոփոխությունների տոկոսի մասեր կազմող արժեքների գրանցման դեպքում սովորական սպեկտրաֆոտոմետրերը հաճախ չեն բավարարում վերը նշված պահանջներին: Այդ հիմնախնդրի սկզբունքային լուծում է հանդիսանում դիֆերենցիալ մեթոդների կիրառությունը, որի էությունը կայանում է հետևյալում. գրանցվում է ոչ թե հետազոտվող նմուշի բացարձակ, այլ դրա և համեմատական նմուշի կլանումների տարբերությունը, ընդ որում, համեմատական նմուշը պետք է ունենա հետազոտվող նմուշի կլանմանը շատ մոտ կլանում: Այսպիսի մոտեցման դեպքում հնարավոր է չափումների զգայունությունը մեծացնել 5-6 անգամ: Ինչպես բացարձակ, այնպես էլ դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդի հիմքում ընկած է Բուգերի, Լամբերտի, Բերի (ԲԼԲ) օրենքը, ըստ որի, եթե հետազոտվող նմուշի լուծույթով կյուվետի վրա ընկնող լուսային հոսքի ինտենսիվությունը  $I_0$  է, իսկ կյուվետից դուրս եկող լույսի ինտենսիվությունը՝  $I$ , ապա լուծույթի օպտիկական խտությունը կորոշվի հետևյալ արտահայտությամբ [53].

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = -\lg T = \varepsilon_{\lambda} c l \quad (22)$$

որտեղ  $T$ -ն նմուշի բացթողնման գործակիցն է,  $\varepsilon_{\lambda}$ -ն կոչվում է կլանման մոլային գործակից,  $l$ -ն օպտիկական ուղու երկարությունն է,  $c$ -ն՝ լուծույթի կոնցենտրացիան:

Ստույգ սպեկտրաֆոտոմետրիկ չափումներ կատարելու համար անհրաժեշտ է նաև մեծ ճշտությամբ ընտրել ալիքի երկարությունը, իսկ չափումները հիմնականում նպատակահարմար է իրականացնել առավելագույն կլանման տիրույթում: Բացի այդ, փորձերի ճշգրտության համար կարևոր է նաև օպտիկական խտությունների տիրույթը:

Ժամանակակից սպեկտրաֆոտոմետրերը թույլ են տալիս չափելու օպտիկական խտությունը  $0 < A < 4$  միջակայքում, սակայն ստացվող արժեքների ճշգրտությունը այդ միջակայքի տարբեր տեղամասերում տարբեր կլինի: Օպտիկական խտության որոշման հարաբերական սխալը արտահայտվում է հետևյալ բանաձևով [142].

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta I}{I_0} \cdot \frac{\lg e}{A \cdot 10^{-A}} \quad (23)$$

Նկար 9-ում բերված է  $\Delta A/A$  հարաբերական սխալի կախվածությունը օպտիկական խտության չափվող մեծությունից՝  $A$ -ից, երբ սպեկտրաֆոտոմետրի բաց թողնման սանդղակի ճշգրտությունը՝  $\Delta I/I_0$  հարաբերությունը, 1% է: Բերված գծապատկերից երևում է, որ չափումների համար օպտիմալ տիրույթն ընկած է 0,2-0,7 միջակայքում: Երկճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրերում (նկ. 10) լույսի ճառագայթը մոնոքրոմատորից դուրս գալով՝ բաժանվում է երկու փնջերի, որոնք մոդուլյատորների միջոցով հաջորդաբար ընկնում են երկու միանման կյուվետների վրա, որոնցից մեկում գտնվում է համեմատական, մյուսում՝ չափվող նմուշը: Այդ կյուվետներից դուրս եկող լույսի փնջերը ընկնում են ընդունիչի վրա: Մարքի համապատասխան խցիկներում նմուշներով կյուվետների տեղակայումից հետո գրանցվում է դրանց կլանումների տարբերության արժեքը և ստացվում է համապատասխան սպեկտրը: Չափումների ճշգրտության հետագա մեծացումն իրականացվել է բարձր զգայունությամբ սպեկտրաֆոտոմետրերի մշակման միջոցով: Սակայն նմանատիպ արդյունքի կարելի է հասնել սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացման միջոցով, քանի որ հին սերնդի սարքերն ունեն շատ բարձր զգայունությամբ օժտված օպտիկական և մեխանիկական բնութագրեր [142]:

Փորձարարական հետազոտությունների ճշգրտության մեծացման նպատակով մեր կողմից իրականացվել է բավականին բարձր օպտիկական զգայունությամբ ( $5 \cdot 10^{-4}$  օ.մ.) օժտված PYE Unicam-SP8-100 (Անգլիա) սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացում

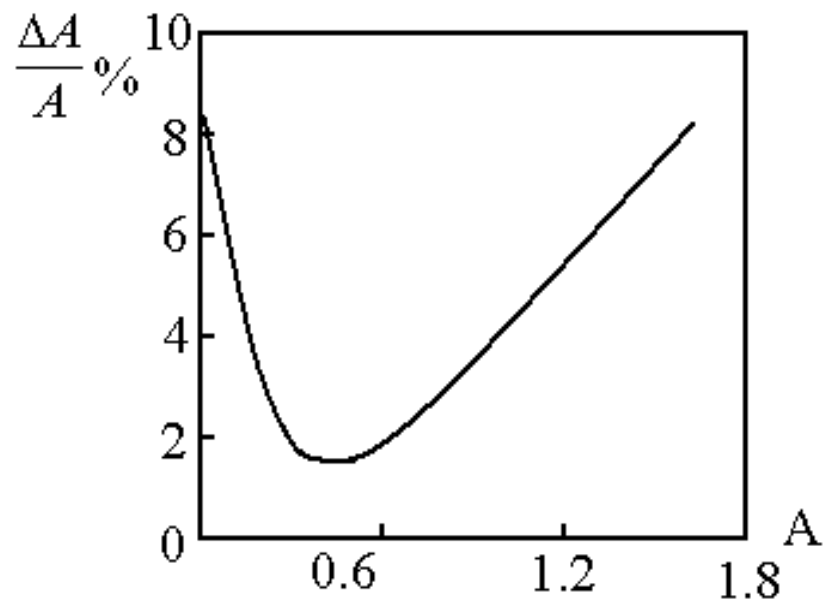
Ժամանակակից տեղեկատվական տեխնոլոգիաների՝ տվյալների հավաքման և LabView միջավայրում ծրագրային ապահովմամբ համապատասխան սարքավորման միջոցով:

Ժամանակակից սարքերի ստեղծման, ինչպես նաև վերը նշված տեխնոլոգիաների մշակման ասպարեզում համաշխարհային վարկանիշ ունի National Instruments կազմակերպությունը, որն արտադրում է փորձարարական հետազոտություններն ավտոմատացնող և LabView միջավայրում տվյալների կուտակման համար նախատեսված բազմապիսի սարքավորումներ [143,144]: LabView ծրագրային միջավայրն օժտված է գրեթե անսահմանափակ հնարավորությամբ, քանի որ թույլ է տալիս նախագծել և կառուցել երևակայական (վիրտուալ) սարքավորումներ, որոնց միջոցով կարելի է ուսումնասիրել տարբեր իրական պրոցեսներ, այդ թվում նաև՝ լաբորատոր և արտադրական: Այս տեսակետից, *de facto* NI ծրագրային և սարքավորումային միջոցները հանդիսանում են ստանդարտներ [143,144]:

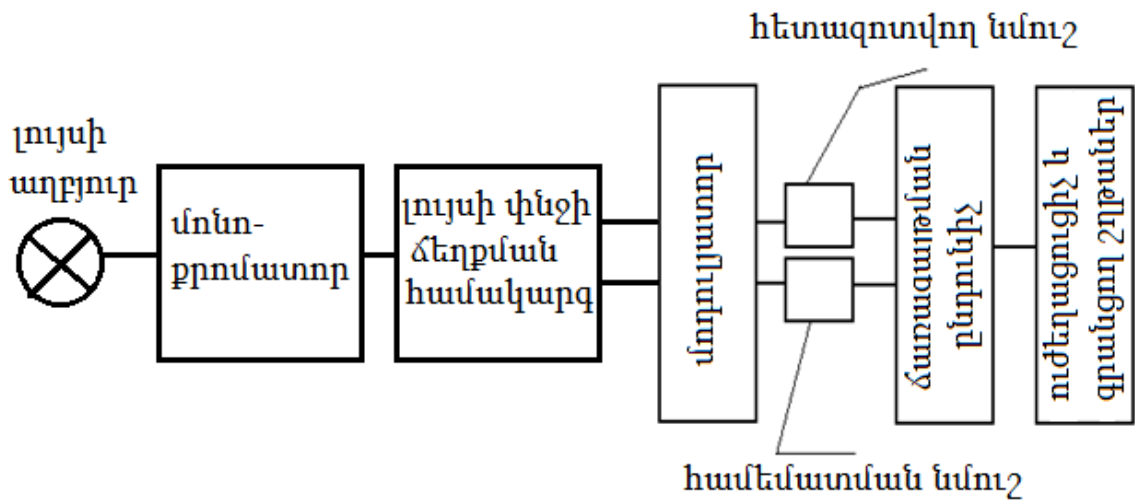
PYE Unicam-SP8-100 սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացման համար ընտրվել է DAQ USB 6008 քարտը, որն ունի ութ անալոգային մուտքեր, որոնք կարող են օգտագործվել ընդհանուր հողակցման նկատմամբ ութ լարումների չափման համար (RSE համակարգ): Այդ մուտքերն օգտագործվել են հետևյալ կերպ (նկ. 11). 0-ական մուտք՝ ներմուծվում է կլանմանը համապատասխանող ազդանշանը (լարումը), մուտք 1 – “բացթողում”, մուտք 2 – առաջին բջջի “ջերմաստիճանը”, 3-5 մուտքեր՝ երկրորդ, երրորդ և չորրորդ բջջիների “ջերմաստիճաններ”, 6 և 7 մուտքեր՝ “պահեստային”:

Համակարգչի և սպեկտրաֆոտոմետրի աշխատանքների սինքրոնացման համար օգտագործվել են երկու տրամաբանական ազդանշաններ, որոնք սպեկտրաֆոտոմետրի ծրագրային բլոկից տրվում են USB 6008 քարտի թվային մուտքերին: Երբ հաղորդվում է տրամաբանական ազդանշան՝ տեղի է ունենում սարքի կողմից ալիքի երկարության փոփոխություն այն միջակայքում, որը տրվում է ծրագրի կողմից, ինչը հանդիսանում է սպեկտրի գրանցման պայման:





Նկար 9.  $\Delta A/A$  սխալի կախվածությունը  $A$ -ի չափվող արժեքներից:



Նկար 10. Երկճառագայթ դիֆերենցիալ սպեկտրաֆոտոմետրի կառուցվածքը:

USB 6008 քարտի չափման դիրքում գտնվող բջջի համարը որոշելու դեպքում բջիջների տեղաշարժման կառավարման բլոկից երեք անալոգային ազդանշաններ են ստացվում: Այսպիսով, տասներկու թվային հոսքերից օգտագործվում են միայն հինգը, իսկ մնացածները հանդիսանում են պահեստային:

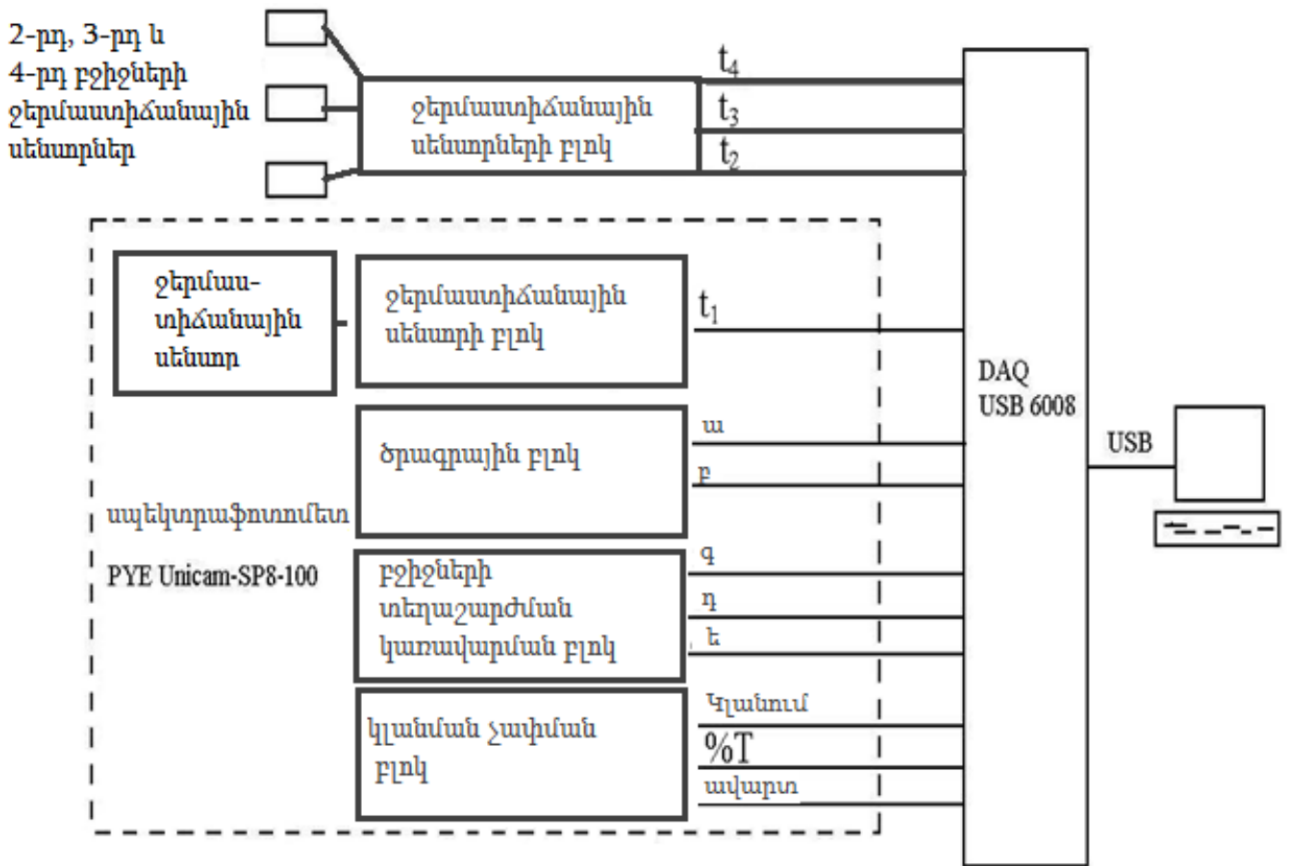
Սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացումը այն դարձրել է համապիտանի սարքավորում, որը կարելի է կիրառել որոշակի խնդիրների հետազոտման համար՝ օգտվելով համապատասխան ծրագրային փաթեթներից:

ԴՆԹ-ի և լիզանդների հետ նրա կոմպլեքսների հալման, ինչպես նաև սպեկտրասկոպիկ տիտրման ուսումնասիրությունների համար մշակվել են երկու ծրագրեր: Առաջինը մշակված է հալման համար և հիմնված է հիպերքրոմային երևույթի վրա [53,145,146]: Այդ մեթոդը կայանում է նրանում, որ հալման պրոցեսում տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի կլանման սպեկտրի փոփոխություն ուլտրամանուշակագույն (ՈւՄ) տիրույթում: ԴՆԹ-ի դենատուրացիան հանգեցնում է նրան, որ  $\lambda=260$  նմ ալիքի տակ կլանման մաքսիմումը մեծանում է 30-40%-ով: Հալման ընթացքում սպեկտրաֆոտոմետրի վրա կարելի է դուրս բերել կամ կլանման, կամ ջերմաստիճանի արժեքը, ուստի փորձի սկզբում սովորաբար չափվում է լուծույթի ջերմաստիճանը, այնուհետև կլանման արժեքները, վերջում՝ կրկին ջերմաստիճանը:

Չափման ընթացքում ընդունվում է այն դեպքը, երբ ջերմաստիճանը աճում է գծայնորեն և ջերմաստիճանային քայլը որոշվում է հետևյալ արտահայտությամբ.

$$t_i = t_{i-1} + \frac{t_n - t_0}{n - 1} \quad (24)$$

որտեղ  $n$ -ը կատարված քայլերի թիվն է կլանման գրանցման ընթացքում: Այս տեսակետից հատկանշական է, որ սպեկտրոֆոտոմետրի արդիականացման և մշակված ծրագրի շնորհիվ հնարավորություն է ընձեռվում միաժամանակ և ավելի մեծ ճշգրտությամբ գրանցելու կլանման՝  $A$ -ի և ջերմաստիճանի՝  $t^{\circ}\text{C}$ -ի արժեքները ամեն քայլում և անկախ՝ յուրաքանչյուր բջջում: Այսպիսի մոտեցումը մեծացնում է ստացվող տվյալների հավաստիությունը [142]:



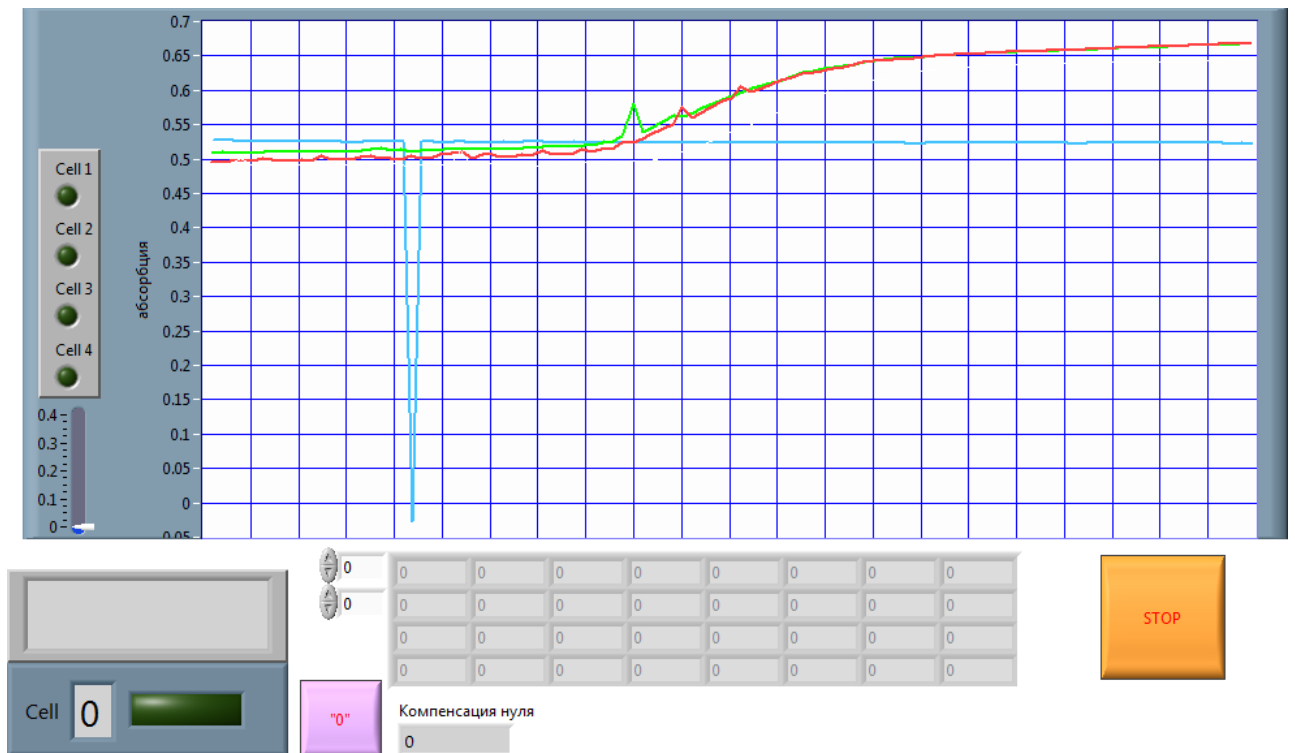
Նկար 11. ա – Տրամաբանական ազդանշան «ժրագիրը կատարվում է»;  $p$  – տրամաբանական ազդանշան «Ալիքի ընթացիկ երկարությունը գտնվում է լուսածրման տրված միջակայքում»;  $q, \eta, \epsilon$  – տրամաբանական երեք ազդանշաններ, որոնք որոշում են այն բջիջի համարը, որը գտնվում է չափման դիրքում; կլանում – «Կլանում» հրահանգի անալոգային ազդանշանը;  $t_1$ -առաջին բջիջի ջերմաստիճանային սենսորի անալոգային ազդանշանը;  $t_2$ ;  $t_3$ ;  $t_4$  – 2, 3 և 4 բջիջների ջերմաստիճանային սենսորի անալոգային ազդանշանները;  $\%T$  – լույսի բաց թողման գործակցի անալոգային ազդանշանը:

Համապատասխան ծրագրում ստացված տվյալները այնուհետև արխիվացվում են և կարող են մշակվել ըստ առաջադրված խնդրի պայմանների: Մասնավորապես, հալման փորձերում այդ տվյալները մշակվել են նաև LabView միջավայրում, որի շնորհիվ կարելի է ստանալ տվյալ պրոցեսի թերմոդինամիկ պարամետրերը: Նկ. 12-ում ներկայացված է հալման պրոցեսի ուսումնասիրման ծրագրի արտաքին պատը:

Երկրորդ ծրագիրը մշակված է ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների փոխազդեցության սպեկտրոֆոտոմետրիկ տիտրման եղանակով ուսումնասիրության համար: Այդ նպատակով ստացվել են ԴՆԹ-լիգանդ (տվյալ դեպքում՝ ԴՆԹ-ԷԲ) կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները: Համապատասխան ծրագրի միջոցով ստացված են արտաքին պատը (նկ. 13 ա) և կլանման սպեկտրները (նկ. 13 բ):

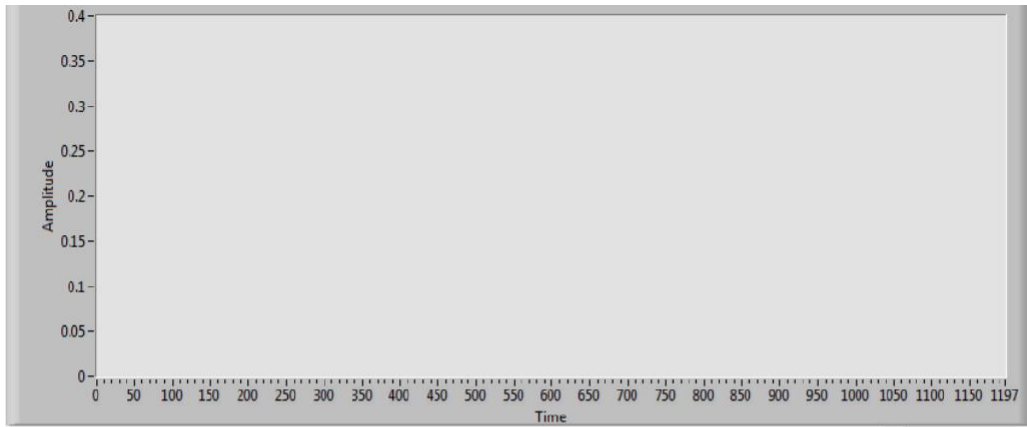
Բացի հիմնական չափման չորս բջիջներից, սպեկտրաֆոտոմետրն ունի նաև համեմատման համար նախատեսված չորս բջիջներ, ինչը թույլ է տալիս նաև դիֆերենցիալ չափումներ կատարել: Սակայն սպեկտրոֆոտոմետրի արդիականացումից հետո դիֆերենցիալ չափումների համար համեմատական բջիջների կիրառության անհրաժեշտությունը վերացել է, քանի որ այդ չափումները կատարվում են համապատասխան ծրագրի շնորհիվ, որը թույլ է տալիս սկզբում չափելու լուծիչի (բուֆերի) կլանումը, այնուհետև ստանալու դիֆերենցիալ կլանման արժեքները [143,144]: Սպեկտրների ստացումից և հետազոտվող նմուշի կլանման մաքսիմումին համապատասխանող ալիքի երկարության որոշումից հետո կատարվում է տվյալների վերլուծություն:

Այսպիսով, սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացումը թույլ է տվել մեծացնել չափումների հավաստիությունը, քանի որ մեծացել է կլանման կամ ջերմաստիճանի գրանցման ճշգրտությունը շնորհիվ անալոգա-թվային վերափոխիչի, ադմուկների ցածր շեմի և թվային գոտիչների: Ջերմաստիճանի չափման ճշգրտությունը մեծացել է այն հանգամանքի շնորհիվ, որ այդ մեծությունը ամեն անգամ չափվում է կլանման գրանցման պահին՝ յուրաքանչյուր բջիջի համար առանձին: Բացի վերը նշվածից, սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացումը մեծացրել է հետազոտությունների շրջանակը՝ համապատասխան ծրագրերի շնորհիվ: Մասնավորապես, ծրագրային գաղտնագրի միջոցով կարելի է փորձի մեջ ներմուծել պոտենցիալի, փուլային անցումների չափում և այլն [145,146]:



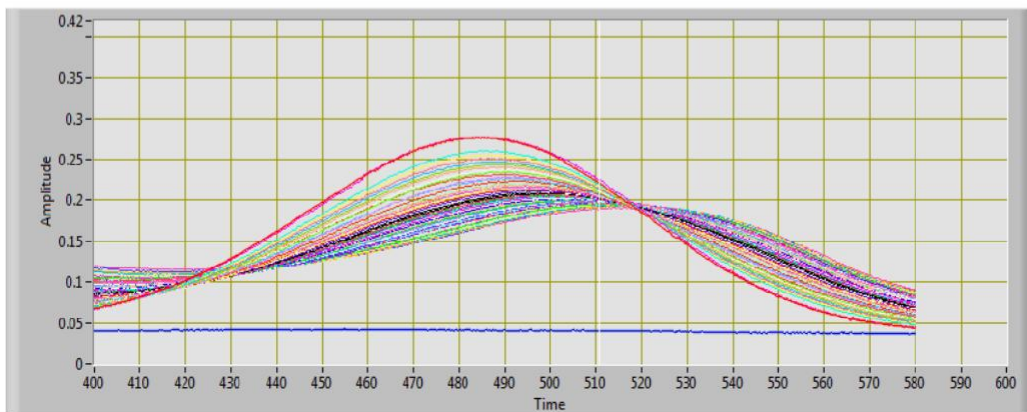
Նկար 12. Հալման ուսումնասիրության ծրագրի արտաքին պատրը:

Lamda  
  
  
 Stop  
 Cell

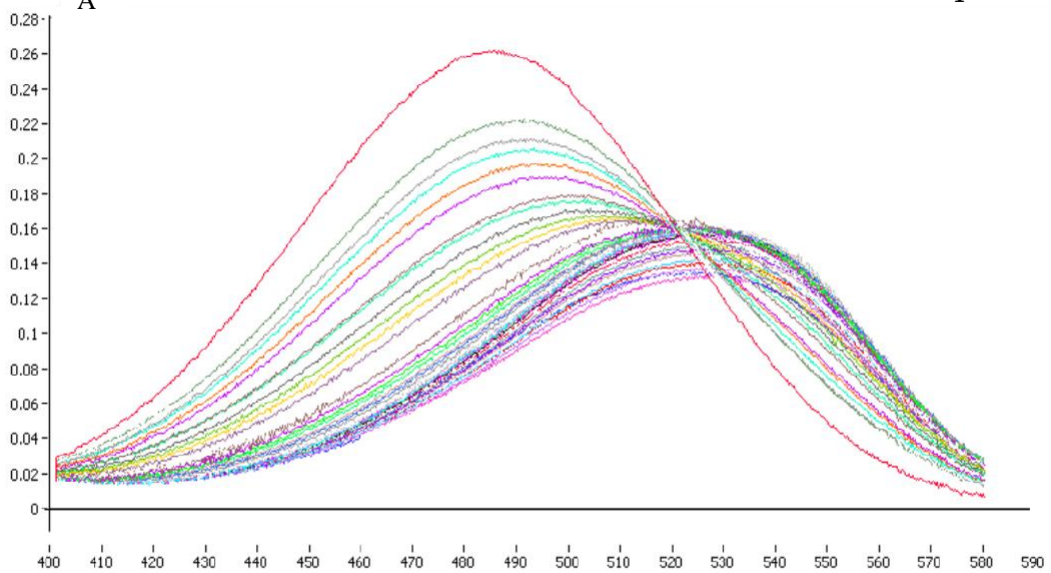


ա

Coments



A



բ

Նկար. 13. ա) Սպեկտրաֆոտոմետրիկ տիտրման հետազոտության ծրագրի արտաքին պատր; բ) ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները:

### 3.2. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունը

Լիզանդների հետ ԴՆԹ-ի փոխազդեցության հետազոտությունները կարևոր են, քանի որ վերջինս կարգավորում է բջջում տեղի ունեցող կարևորագույն գործընթացներ՝ գտնվելով տարբեր միացությունների շրջապատում: Այդ միացությունները ձևավորում են տարբեր տիպի համամիացություններ ԴՆԹ-ի հետ և ներազդում ինչպես դրա կառուցվածքի, այնպես էլ վերը նշված գործընթացների վրա: Այդ հետազոտությունները նաև կարևոր են այն տեսանկյունից, որ կարող են հիմք հանդիսանալ ԴՆԹ-ի հետ անմիջականորեն կապվող նոր դեղանյութերի սինթեզի համար [1-5]:

Օրգանական կամ անօրգանական միացությունները ԴՆԹ-ի հետ կարող են կապվել տարբեր եղանակներով և տարբեր տիպի՝ կովալենտ և ոչ կովալենտ քիմիական կապերի միջոցով: ԴՆԹ-ի հետ ոչ կովալենտ փոխազդեցության դեպքում միացությունները՝ լիզանդները, կապվում են էլեկտրաստատիկ, ջրածնական, վան-դեր-Վաալսյան և հիդրոֆոբ ուժերի միջոցով (թույլ կապեր [147-153]): Այդ փոխազդեցություններն ընկած են ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների տարբեր՝ ինտերկալյացիոն կամ ակոսային մեխանիզմներով կապման հիմքում: Ընդ որում, եթե լիզանդը լուծույթում գտնվում է կատիոնային վիճակում, ապա այն ԴՆԹ-ի բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի հետ կարող է կապվել նաև էլեկտրաստատիկ եղանակով: Այդ եղանակը համարվում է ոչ սպեցիֆիկ և, սովորաբար, լիզանդը կապվում է ԴՆԹ-ի հետ արտաքին կողմից՝ շղթայի երկայնքով: Էլեկտրաստատիկ եղանակով կապման դեպքում ԴՆԹ-ի հետ լիզանդի կապված մոլեկուլների թիվը անհամեմատ մեծ է, քան ինտերկալյացիոն կամ ակոսային կապման դեպքում [154-175]:

Կապվելով նուկլեինաթթուների, սպիտակուցների կամ լիպիդների հետ և կլանելով լույսի ֆոտոնը՝ ՄԿ-ը անցնում է լուսասակտիվացված վիճակի և փոխազդում է թթվածնի մոլեկուլների հետ, որի արդյունքում այդ լիզանդի կողմից կլանված ֆոտոնի էներգիան փոխանցվում է թթվածնին և վերջինս անցնում է սինգլետային, ակտիվացված վիճակի և ուժգնորեն փոխազդում է մակրոմոլեկուլների տարբեր խմբերի հետ՝ առաջացնելով վնասվածքներ դրանց առաջնային կառուցվածքում: ՄԿ-ի այս հատկությունը ընկած է այն հետազոտությունների հիմքում, որոնք մշակվում են,

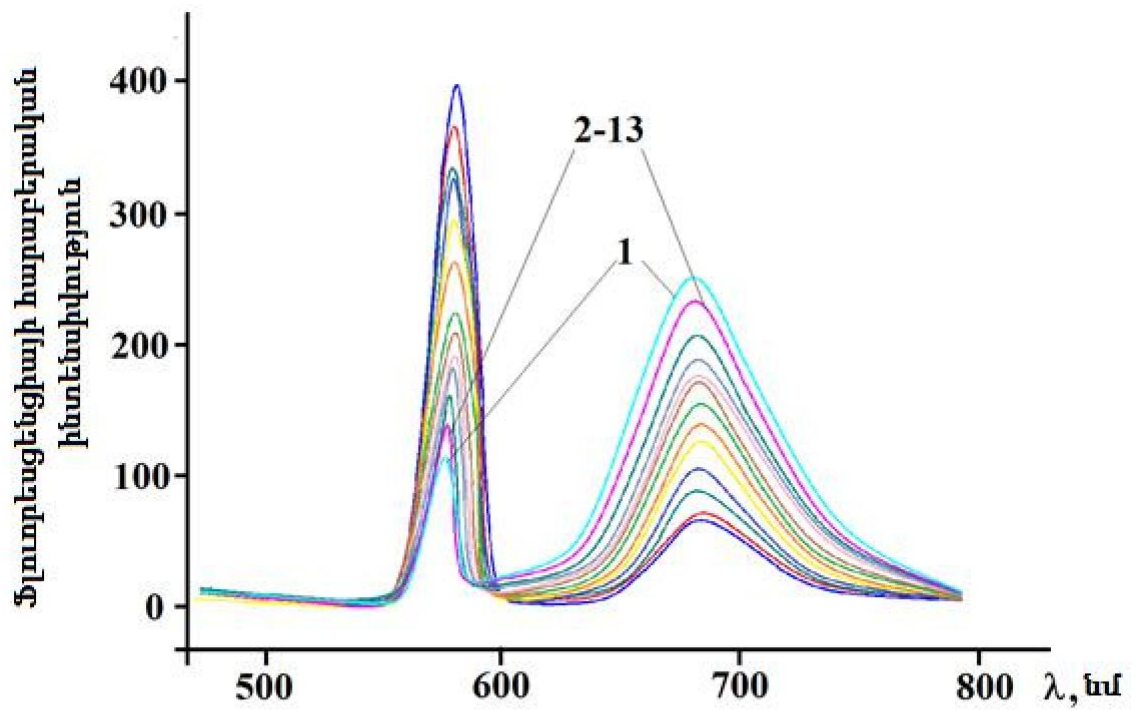


որպեսզի սինթեզվեն այդ լիզանդի այնպիսի ածանցյալներ, որոնք կարող են որոշակի սայտ-ուղղորդված կտրվածքներ առաջացնել ԴՆԹ-ի մոլեկուլում [176-183]:

Համարվում է, որ ՄԿ-ը համահարթ կառուցվածքի հաշվին կապվում է ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոն մեխանիզմով, սակայն այս փաստի հավաստիությունը դեռևս լիովին հաստատված չէ [65]: Սպեկտրասկոպիկ և էլեկտրաքիմիական մեթոդներով կատարված հետազոտությունները ի հայտ են բերել, որ ՄԿ-ը և նրա ածանցյալները ԴՆԹ-ի հետ առավելապես կապվում են էլեկտրաստատիկ եղանակով [58,65]:

ՄԿ-ի առանձնահատկություններից մեկն այն է, որ այս լիզանդը ցուցաբերում է կլանում էլեկտրամագնիսական ճառագայթների կարճալիք ուլտրամանուշակագույն ( $\lambda=270$  նմ մաքսիմումով) և երկարալիք տեսանելի տիրույթում՝  $\lambda=664$  նմ, միննույն ժամանակ, կարող է հետլուսարձակել, նույնպես այդ տիրույթում՝ 500-ից 800 նմ, ինչը կարելի է բացատրել այն փաստով, որ ՄԿ-ի մոլեկուլների գրգռման էներգիան լուսարձակվում է առանց մեծ կորուստների, երբ էլեկտրոնները վերադառնում են հիմնական ստացիոնար ուղեծրի վրա: Նկար 14-ում բերված են ՄԿ-ի (1) և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների (2-13) ֆլուորեսցենցիայի (հետլուսարձակման) սպեկտրները: ՄԿ-ի և ԴՆԹ-ի հետ նրա կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները ստացվել են ալիքի երկարության փոփոխության  $300 \leq \lambda \leq 800$  նմ տիրույթում, երբ գրգռումն իրականացվել է  $\lambda=290$  նմ ալիքի երկարության տակ: Նմանատիպ հետազոտություններում ավելի հաճախ ընդունված է գրգռումն իրականացնել ամենաերկարալիք տիրույթում ի հայտ եկող ֆլուորեսցենցիայի պիկին (գագաթին) առավել մոտ ընկած կլանման տիրույթում ընկած ալիքներով (տես [59]): Մասնավորապես, ՄԿ-ի կլանման մաքսիմումին ( $\lambda=664$  նմ) համապատասխանող ալիքի երկարությամբ գրգռումն իրականացնելիս ֆլուորեսցենցիայի պիկը գրանցվում է  $\lambda=682$  նմ ալիքի տակ, մինչդեռ 290 նմ-ի դեպքում, ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում ի հայտ է գալիս ևս մեկ պիկ 583 նմ ալիքի տակ:

Բազմատոմ օրգանական միացությունների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները սովորաբար միաշերտ են, եթե լուծույթում տեղի չի ունենում այդ միացությունների մոլեկուլների միավորում դիմերների կամ էքսիմերների ձևով: Էքսիմերացման դեպքում այդ նյութերի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում ի հայտ են գալիս նոր



Նկար 14. ՄԿ-ի (1) ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների (2-13) ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները՝ ԴՆԹ/լիզանդ հարաբերության՝  $r$ -ի փոփոխության  $0 \leq r \leq 1,0$  միջակայքում,  $pH=7,0$ ,  $t=25^{\circ}C$  և  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}$  մոլ իոնական ուժի պայմաններում:

պիկեր, սակայն ֆլուորեսցենցիայի հիմնական պիկի նկատմամբ դրանք միշտ շեղվում են դեպի ավելի երկարալիք տիրույթ և ունեն անհամեմատ ավելի փոքր ինտենսիվություն [54,141]: Մյուս կողմից, էքսիմերացումը սովորաբար տեղի է ունենում այն դեպքում, երբ լուծույթում լիզանդի կոնցենտրացիան մեծ է ( $C > 10^{-4}$  մոլ/լ), կամ ավելի փոքր կոնցենտրացիաների ( $C > 10^{-5}$  մոլ/լ) դեպքում, եթե առկա է մակրոմոլեկուլ (օրինակ՝ ԴՆԹ): Այս տեսակետից, մեր կողմից իրականացված հետազոտություններում ՄԿ-ի կոնցենտրացիան եղել է  $\sim 10^{-6}$  մոլ/լ, ուստի դիմերացման կամ էքսիմերացման աստիճանը եղել է աննշան կամ այդ պրոցեսը տեղի չի ունեցել, քանի որ այդ լիզանդի և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում, երկարալիք տիրույթում, լրացուցիչ պիկեր չեն գրանցվել: Հետևաբար, ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում առկա երկու պիկերը 583 և 682 նմ ալիքների տակ հանդիսանում են այդ լիզանդի ֆլուորեսցենցիայի առանձնահատկության արդյունք:

Լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց դիտվում է ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարում 682 նմ-ում (տես [63]): Այդ աշխատանքում ցույց է տրվել, որ ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարումը պայմանավորված է ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի մեջ այդ լիզանդի մոլեկուլների ինտերկալյացիայով: ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակի պարզաբանման նպատակով ստացվել է ֆլուորեսցենցիայի մարման հաստատունի արժեքը Շտեռնի-Վոլմերի մեթոդով [63].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K [ԴՆԹ] \quad (25)$$

որտեղ  $F_0$ -ն և  $F$ -ը համապատասխանաբար ՄԿ-ի ազատ և ԴՆԹ-ի հետ կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություններն են,  $K_{sv}$ -ը ֆլուորեսցենցիայի մարման հաստատունն է և կոչվում է Շտեռնի-Վոլմերի հաստատուն: Նկար 15-ում բերված է  $F_0/F$  հարաբերության կախվածության կորը ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայից: Բերված նկարից երևում է, որ այդ կորը գծայնորեն է կախված ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի աճից, ընդ որում  $K_{sv} = 4,2 \cdot 10^4$  լ/մոլ: Դա ՄԿ-ի ազատ մոլեկուլների հետ համեմատած ԴՆԹ-ի հետ կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության նվազման արդյունք է 682 նմ ալիքի տակ: Չնայած այս արդյունքը լավ համապատասխանության մեջ է գրական տվյալների հետ, այնուամենայնիվ, ֆլուորեսցենցիայի մարումը ԴՆԹ-ով

չի կարելի համարել ՄԿ-ի մոլեկուլների ինտերկալացիայի արդյունք: Առավել հավանական է այն, որ ՄԿ/ԴՆԹ հարաբերության մեծ արժեքների դեպքում լիզանդի մոլեկուլները ԴՆԹ-ի հետ կապվում են էլեկտրաստատիկ եղանակով, որն էլ բերում է ֆլուորեսցենցիայի մարմանը: Միննույն ժամանակ, 583 նմ-ի տակ տեղի է ունենում ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճ՝ լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց: Այս երևույթը հանդիսանում է ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդի ինտերկալացիոն մեխանիզմով փոխազդեցության հետևանք: Սակայն 682 նմ-ի տակ դիտվող մարումը կարող է տեղի ունենալ այն դեպքում, երբ լիզանդի կապված մոլեկուլները ոչ լրիվ էկրանավորվեն մարիչների՝ լուծված թթվածնի և ջրի մոլեկուլներից: Հետևաբար մենք կարծում ենք, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման առավել հավանական մեխանիզմը ոչ լրիվ ինտերկալացիան է:

ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցությունը ուսումնասիրվել է նաև կլանման սպեկտրասկոպիայի (ԿՍ) մեթոդով: Նկար 16-ում բերված են ՄԿ-ի և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները՝ ալիքի երկարության փոփոխության  $220 \leq \lambda \leq 750$  նմ տիրույթում: Բերված նկարից երևում է, որ ՄԿ-ի (1 կորը) կլանման մաքսիմումը համապատասխանում է 664 նմ ալիքի երկարությանը, ընդ որում, կլանման սպեկտրի վրա առկա է ուս 620 նմ-ի տակ: ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց դիտվել է ՄԿ-ի կլանման մաքսիմումների նվազում (հիպոքրոմային էֆեկտ), ընդ որում,  $r$ -ի համեմատաբար մեծ արժեքների դեպքում ( $r \geq 0,2$ ) հիմնականում դրսևորվում է միայն հիպոքրոմային էֆեկտը, մինչդեռ  $\lambda_{max}$ -ի շեղում գործնականում չի հայտնաբերվել: ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի հետագա մեծացման արդյունքում ( $r < 0,2$ ) հիպոքրոմային էֆեկտի հետ համատեղ դիտվել է նաև  $\lambda_{max}$ -ի շեղում դեպի երկարալիք տիրույթ (գրեթե 5-6 նմ-ով): Հայտնի է, որ կարմիր ալիքային շեղումը և հիպոքրոմային էֆեկտը դիտվում են այն լիզանդների կլանման սպեկտրներում, որոնք կապվում են ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալացիոն եղանակով:

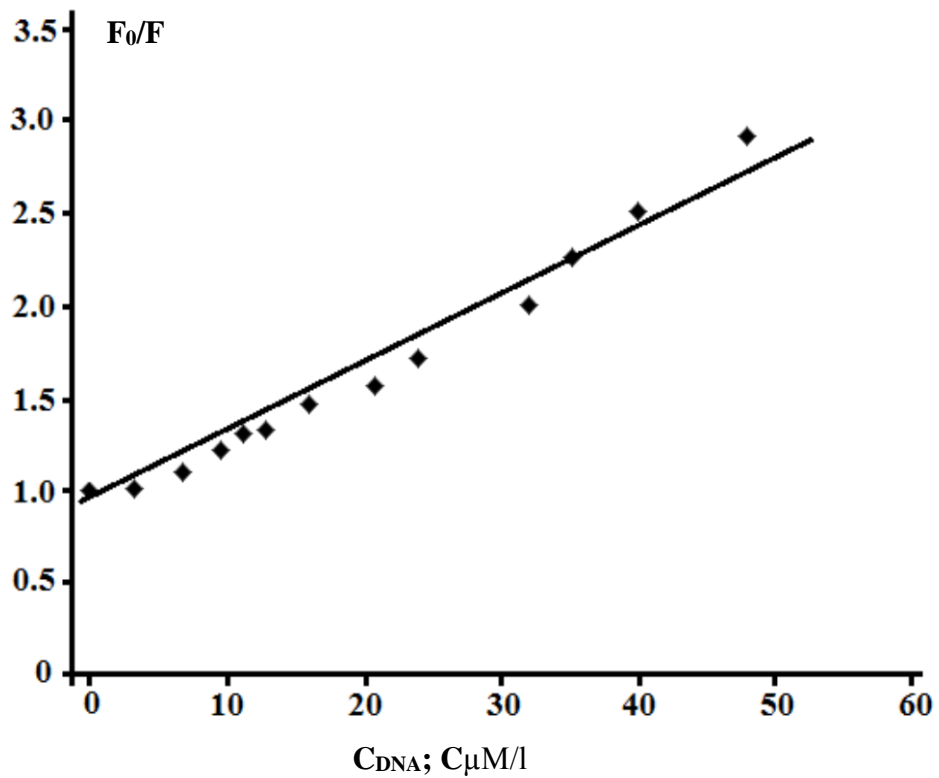
Հետևաբար, ՄԿ-ի կլանման սպեկտրների փոփոխությունները, ԴՆԹ-ի հետ կապվելիս, չեն կարող հանդիսանալ ինտերկալացիոն եղանակով կապման արդյունք: Մասնավորապես, մեկից ավելի արմատիկ օղակների համակարգից կազմված լիզանդների, օրինակ՝ էԲ-ի, ակտինոմիցին Դ-ի (ԱՄԴ), պրոֆլավինի ինտերկալացիայի դեպքում կարմիրալիքային շեղումը կազմում է գրեթե 40-50 նմ

[61-63]: Մյուս կողմից ցույց է տրվել, որ միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության դեպքում տեղի է ունենում լիզանդի մոլեկուլների ոչ լրիվ ինտերկալյացիա (կիսաինտերկալյացիա), ինչը ուղեկցվում է ոչ մեծ երկարալիք շեղմամբ [153,154]: Հետևաբար, մենք կարծում ենք, որ ՄԿ-ը երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ կապվում է կիսաինտերկալյացիոն եղանակով: Այս փաստը հաստատվում է նաև նրանով, որ երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման դեպքում կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների վարքը միանգամայն տարբերվում է երկշղթա ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների համապատասխան սպեկտրների վարքից (տես. [153]):

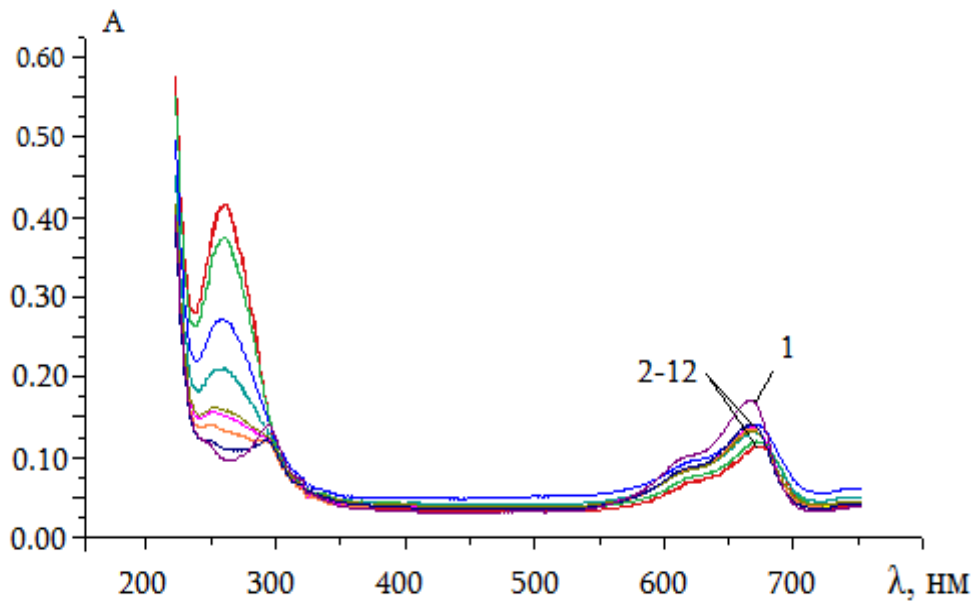
Ավելի վաղ ցույց էր տրվել, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ կարող է փոխազդել մի քանի եղանակներով, ինչը արտացոլվում է ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդի կոմպլեքսների սպեկտրների բնութագրերի վրա: Այդ սպեկտրների հիման վրա ստացվել են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման կորերը Սկետչարդի կոորդինատներով ( $r/C_f$  և  $r$ , որտեղ  $r$ -ը ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների թիվն է,  $C_f$ -ը լիզանդի ազատ մոլեկուլների կոնցենտրացիան է լուծույթում ( $r/C_f$  և  $r$  կոորդինատների ստացումը ներկայացված է Գլուխ 2-ում)), որոնք բերված են նկար 17-ում (տես [153]):

Բերված նկարից երևում է, որ ֆլուորեսցենցիայի և կլանման սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման կորերը (համապատասխանաբար 1 և 2 կորերը) չեն համընկնում միմյանց հետ, ընդ որում, կոր 2-ը ուղղագիծ չէ, ինչպես կոր 1-ը և կազմված է երկու ուղղագիծ տեղամասերից ( $2_1$  և  $2_2$  հատվածները): Դա պայմանավորված է նրանով, որ լիզանդը մակրոմոլեկուլի հետ կապվում է երկու կամ ավելի, տարբեր եղանակներով:

Սկետչարդյան կոորդինատներով ստացված ուղղագիծ կապման կորերը սովորաբար համապատասխանում են այն դեպքերին, երբ մակրոմոլեկուլների վրա առկա են մեկից ավելի, սակայն իրար համարժեք կապման տեղեր, որոնցից յուրաքանչյուրի հագեցումը լիզանդի մոլեկուլով կախված չէ մյուսի հագեցվածության աստիճանից [53,153]: Կապման ուղղագիծ կորը (կոր 1-ը) վկայում է, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիան համապատասխանում է կապման մեկ՝ ինտերկալյացիոն եղանակին, մինչդեռ ոչ ուղղագիծ կորը (կոր 2-ը) համապատասխանում է կամ հակակոոպերատիվ, կամ մեկից ավելի եղանակներով փոխազդեցությանը [53]: Հայտնի է, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է մի քանի



Նկար 15.  $F_0/F$  հարաբերության կախվածության կորը ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայից: ՄԿ-ի կոնցենտրացիան կազմել է  $1.6 \text{ մկմոլ/լ}$ ;  $pH=7,0$ ,  $t=25^{\circ}C$ ,  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2} \text{ մոլ}$ :  $F_0$ -ն ՄԿ-ի ազատ,  $F$ -ը ԴՆԹ-ի հետ կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություններն են:



Նկար 16. ՄԿ-ի ազատ (1) և ԴՆԹ-ի հետ կապված (2-12) մոլեկուլների կլանման սպեկտրները  $r$ -ի փոփոխության  $0 \leq r \leq 1,0$  միջակայքում,  $\text{pH}=7.0$ ,  $t=25^\circ\text{C}$ ,  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}$  մոլ իոնական ուժի դեպքում:

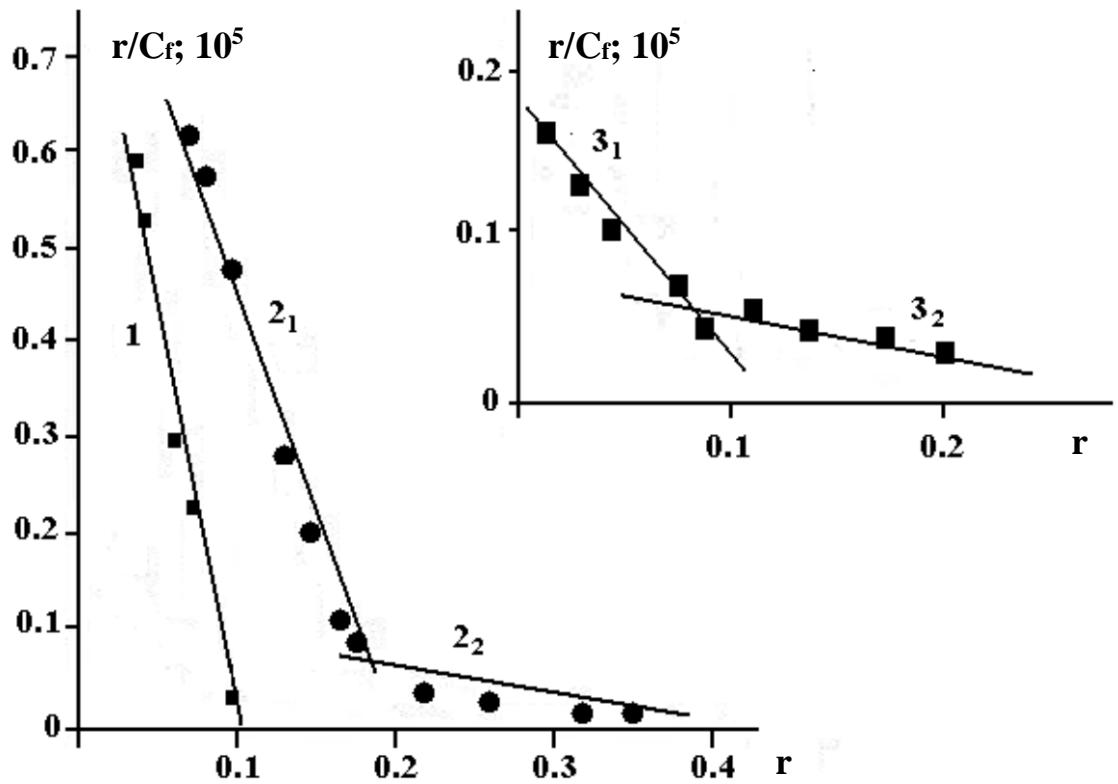
եղանակներով (տես [153-165]), հետևաբար, կոր 2-ը հանդիսանում է այդ փաստի արդյունք, ընդ որում, հաշվի առնելով նաև այն, որ 1 և 2 կորերը չեն համընկնում միմյանց հետ, ակնհայտ է, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ առաջացնում է նաև ֆլուորեսցենցիա չդրսևորող կոմպլեքսներ: Այս հանգամանքը հիմք ընդունելով՝ կոր 2-ի և կոր 1-ի տարբերության միջոցով ստացվել է կոր 3-ը, որը նույնպես ուղղագիծ չէ (3<sub>1</sub> և 3<sub>2</sub> հատվածները, նկ. 17):

Այս փաստը վկայում է այն մասին, որ այդ կորը արդյունք է ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման առնվազն երկու եղանակների, որոնք ֆլուորեսցենցիա չեն դրսևորում: Դա կարող է պայմանավորված լինել նրանով, որ լիզանդի կապված մոլեկուլները մատչելի են մարիչների (թթվածնի և ջրի) մոլեկուլներին: Կոր 3-ի վերլուծությունը ի հայտ է բերում կապման ուժեղ և թույլ եղանակներ, ընդ որում, ուժեղ եղանակը համապատասխանում է կիսաինտերկալյացիոն, թույլ եղանակը՝ էլեկտրաստատիկ եղանակներով կապմանը: 1-3 կորերից ստացված են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման հաստատունի՝ K-ի և կապման տեղերի թվի՝ n-ի արժեքները: Դիտարժանության համար ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում, որը նույնպես վերցված է աշխատանք [153]-ից: Աղյուսակ 2-ից երևում է, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի թույլ եղանակով կապման հաստատունի արժեքը երկու կարգով փոքր է ուժեղ, ինտերկալյացիոն եղանակով և մեկ կարգով փոքր է ուժեղ, կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապման հաստատունների արժեքներից:

Փաստացի, այդ տվյալները բացահայտել են, որ ԷԲ-ը երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ կապվում է առնվազն երեք եղանակներով՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ: Այդ փաստը հաստատվում է նաև համապատասխան եղանակներով կապման տեղերի թվի արժեքների միջոցով [153]:

Մեր կողմից նմանատիպ մոտեցում է կիրառվել ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման կորերի ստացման համար, որոնք բերված են նկար 18-ում: ՄԿ-ի դեպքում կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացված փորձարարական կետերը համընկել են իրար հետ, ուստի կապման կորի վրա ներկայացված են ընդհանրացված կետերը: Լուծույթի  $\mu=2,0 \cdot 10^{-2}$  մոլ իոնական ուժի պայմաններում (14)-ի միջոցով ստացված կապման կորը r-ի փոքր արժեքների դեպքում ուղղագիծ է ընդհուպ մինչև





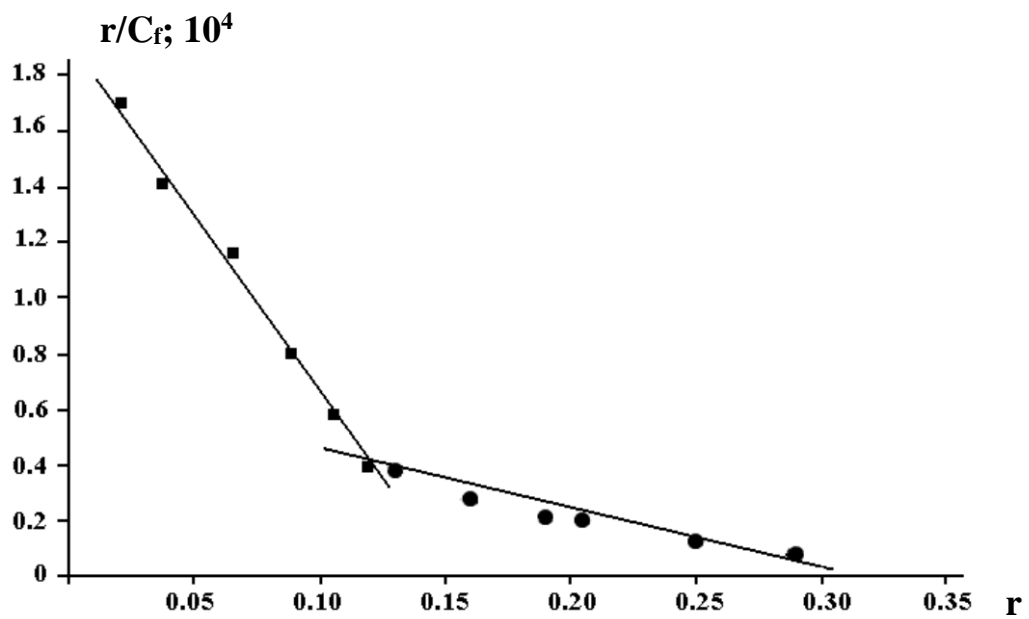
Նկար 17. ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման կորերը Սկետչարդի կոորդինատներով: Կոր 1-ը ստացվել է ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի, կոր 2-ը՝ կլանման սպեկտրների հիման վրա: Կոր 3-ը ստացվել է կոր 2-ի և կոր 1-ի տարբերությունից և համապատասխանում է ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիա չդրսևորող կոմպլեքսներին; pH=7,0, t=25 °C,  $\mu=2 \cdot 10^{-2}$  մոլ [153]:

Երկշղթա ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների K-ի և n-ի արժեքները;  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}$  մոլ,  $t=25$  °C,  
 $pH=7,0$ .

Երկշղթա ԴՆԹ			
$K_s''$	$130 \cdot 10^4 M^{-1}$	$n_s''$	9
$K_{s\phi}$	$100 \cdot 10^4 M^{-1}$	$n_{s\phi}$	11
$K_{s\phi}$	$30 \cdot 10^4 M^{-1}$	$n_{s\phi}$	8
$K_{w\phi}$	$1,6 \cdot 10^4 M^{-1}$	$n_{w\phi}$	3
$K_w''$	$1,6 \cdot 10^4 M^{-1}$	$n_w''$	3

- $K_s''$  - կլանման սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման հաստատունի արժեքը ինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցության դեպքում;
- $K_{s\phi}$  - ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման հաստատունի արժեքը ինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցության դեպքում;
- $K_{s\phi}$  - կապման հաստատունի արժեքը ուժեղ, կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում;
- $K_{w\phi}$  - կապման հաստատունի արժեքը թույլ, էլեկտրաստատիկ եղանակով կապման դեպքում;
- $K_w''$  - կլանման սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման հաստատունի արժեքը թույլ, էլեկտրաստատիկ եղանակով կապման դեպքում;
- $n_s''$  - կլանման սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման տեղերի թվի արժեքը;
- $n_{s\phi}$  - ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման տեղերի թվի արժեքը;
- $n_{s\phi}$  - ուժեղ, կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում կապման տեղերի թվի արժեքը;
- $n_{w\phi}$  - կոր 3-ի միջոցով ստացված թույլ եղանակով կապման դեպքում կապման տեղերի թվի արժեքը;
- $n_w''$  - կոր 2-ի միջոցով ստացված թույլ եղանակով կապման դեպքում կապման տեղերի թվի արժեքը.

$r=0,14$ , մինչդեռ  $r>0,14$  արժեքների դեպքում կորը բեկվում է և դրա վրա ի հայտ է գալիս կապման երկրորդ՝ ուղղագիծ տեղամասը: Երկու վառ արտահայտված ուղղագիծ հատվածների առկայությունը կապման կորի վրա վկայում է, որ այդ ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի հետ փոխազդում է առնվազն երկու եղանակներով՝ ուժեղ, որը բնութագրվում է  $K\approx 6,5\cdot 10^5 M^{-1}$ ,  $n\approx 4$  և թույլ, որը բնութագրվում է  $K\approx 1,5\cdot 10^5 M^{-1}$ ,  $n\approx 2$  պարամետրերով. կապվում են ԴՆԹ-ի բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի հետ էլեկտրաստատիկ եղանակով, որի արդյունքում կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը նվազում է 682 նմ-ի տակ, իսկ կլանման սպեկտրների մաքսիմումները նվազում են միայն 664 նմ ալիքի տակ:  $r$ -ի փոքր արժեքների դեպքում ի հայտ է գալիս կապման երկրորդ եղանակը, որը համապատասխանում է կիսահետերկայացիոն մեխանիզմին: Այդ դեպքում ՄԿ-ի մոլեկուլները ներդրվում են ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկի հարևան ազոտային հիմքերի հարթությունների միջև: Այսպիսով, ստացված տվյալները բացահայտել են, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակները կախված են դրանց կոնցենտրացիաների մոլային հարաբերությունից՝  $r$ -ից: Այդ հարաբերության մեծ արժեքների դեպքում ՄԿ-ի դրական լիցքավորված մոլեկուլները



Նկար 18. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման կորը Սկետչարդյան կոորդինատներով: Կապման կորի վրա տեղադրված են կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացված կետերը, որոնք համընկել են միմյանց հետ; pH=7,0, t=25 °C,  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}$  մոլ:

### 3.3. ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսագոյացման թերմոդինամիկ հետազոտությունները

ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության փորձարարական, ինչպես նաև գրականության տվյալները ցույց են տալիս, որ այդ լիգանդը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է երկու կամ ավելի եղանակներով, որոնց դրսևորումը կախված է լուծույթի իոնական ուժից, ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային զույգերի հաջորդականությունից և ԴՆԹ/լիգանդ կոնցենտրացիոն հարաբերությունից [3,65]: Ընդ որում, ներկայումս դեռևս քննարկվում են տարբեր մեխանիզմներ, որոնք հանդիսանում են ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի փոխազդեցության հիմնական եղանակ: Մասնավորապես, որպես հիմնական եղանակ նշվում է ինտերկալյացիան (հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ այդ լիգանդը համանման է դասական ինտերկալյատոր էթիդիումի բրոմիդին) [55,65], որոշ աշխատանքներում նշվում է նաև ակոսային մեխանիզմով կապումը [66-68]: Դրա հետ մեկտեղ գրականության մեջ գրեթե բացակայում են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության թերմոդինամիկ հետազոտությունները:

#### 3.3.1. ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների հալումը

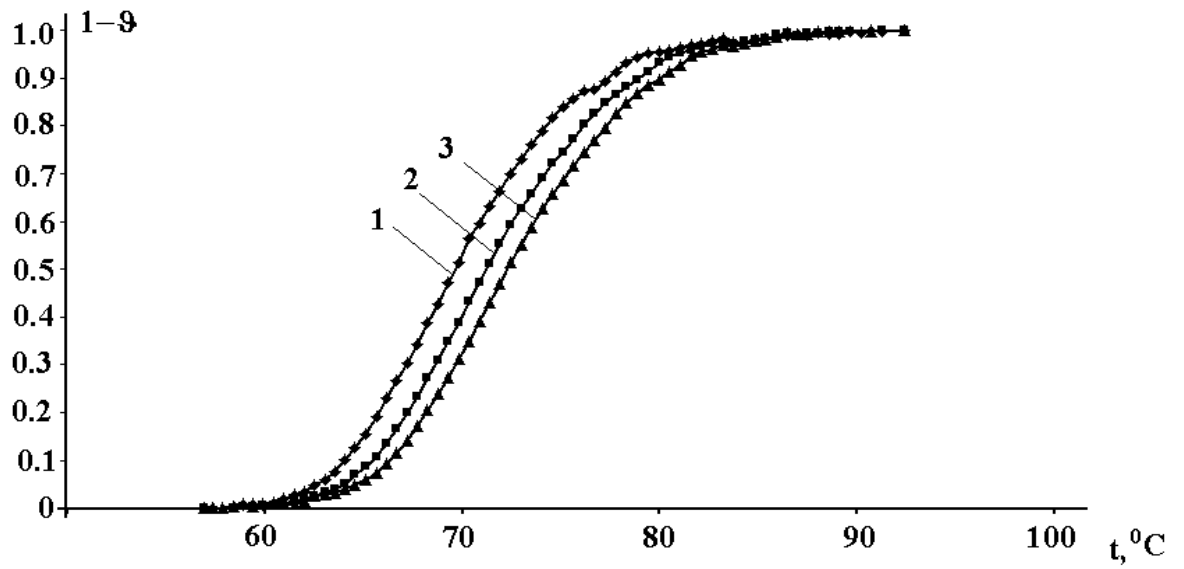
ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակները ճշգրտելու, ինչպես նաև այս կամ այն կապման եղանակի դրսևորման համար անհրաժեշտ պայմանները բացահայտելու համար իրականացվել է դրանց կոմպլեքսների հալում՝ լուծույթի 0.002 և 0.02 մոլ իոնական ուժերում: Նկ. 19-ում բերված են ԴՆԹ-ի (կոր 1) և ՄԿ-ի հետ (կոր 2 և 3) ԴՆԹ-ի կոմպլեքսների հալման կորերը 0.02 մոլ իոնական ուժով լուծույթում (նմանատիպ կորեր ստացվել են նաև 0.002 մոլ դեպքում, այդ պատճառով կորերը բերված չեն):

Ինչպես երևում է բերված նկարից, ԴՆԹ-ի հալման կորի համեմատ կոմպլեքսների հալման կորերը տեղաշարժված են դեպի բարձր ջերմաստիճանային տիրույթ: Դա վկայում է այն մասին, որ այդ լիգանդը նախընտրելիորեն կապվում է երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ՝ կայունացնելով այն, ընդ որում, այդ էֆեկտը դրսևորվում է  $0 < r \leq 0,33$  միջակայքում, որտեղ  $r = [\text{լիգանդ}]/[\text{ԴՆԹ}]$ : Այդ կորերից որոշվել են հալման ջերմաստիճանի՝  $T_m$ -ի և հալման միջակայքի լայնության՝  $\Delta T$ -ի արժեքները: Ստացված տվյալներից երևում է, որ  $T_m$ -ը, ինչպես նաև  $\Delta T$ -ն աճում են՝ լիգանդի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց:

Սակայն ՄԿ-ի կոնցենտրացիայի որոշակի արժեքների դեպքում  $\Delta T$ -ի արժեքը սկսում է աննշան փոփոխվել: Հաշվարկվել են  $T_m$ -ի և  $\Delta T$ -ի փոփոխությունները՝  $\delta T_m$ -ը ( $\delta T_m = T_m - T_0$ , որտեղ  $T_m$ -ը համապատասխանաբար ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների,  $T_0$ -ն՝ ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճաններն են) և  $\delta \Delta T$ -ն ( $\delta \Delta T = \Delta T - \Delta T_0$ ,  $\Delta T$ -ն համապատասխանաբար ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների,  $\Delta T_0$ -ն ԴՆԹ-ի հալման միջակայքի լայնություններն են): Նկ.20-ում բերված են  $r$ -ից  $\delta T_m$ -ի կախվածության կորերը 0,02 և 0,002 մոլ իոնական ուժերում: Ինչպես երևում է բերված նկարից, այդ կորերը մոնոտոն աճում են լիզանդի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց: Վերջինս վկայում է այն մասին, որ ՄԿ-ը նախընտրելիորեն կապվում է ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի հետ՝ կայունացնելով այն: Ընդ որում, այդ էֆեկտը ավելի արտահայտված է լուծույթում աղի ավելի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում, քանի որ 0,002 մոլ իոնական ուժում հալման ջերմաստիճանի փոփոխությունը ավելի մեծ է (կոր 1), քան 0,02 մոլ իոնական ուժում:

Ամենայն հավանականությամբ, դա պայմանավորված է նրանով, որ լուծույթի ցածր իոնական ուժերի դեպքում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ը նախընտրելիորեն կապվել է ինտերկալյացիոն եղանակով, քանի որ այդ պայմաններում լիզանդի մոլեկուլները բևեռացված, ջրային միջավայրից ներդրվում են ԴՆԹ-ի հիմքերի զույգերի հարթությունների մեջ, որը հանդիսանում է ոչ բևեռացված հիդրոֆոբ միջավայր: Այս արդյունքները լավ համապատասխանության մեջ են գրական տվյալների հետ (տես [66,68]): Այդ աշխատանքներում ցույց է տրված, որ ցածր իոնական ուժերում ՄԿ-ի կապման հիմնական եղանակը հանդիսանում է ինտերկալյացիան: Ինտերկալյացիայի հետ մեկտեղ ՄԿ մոլեկուլները ԴՆԹ-ի հետ կարող են կապվել նաև էլեկտրաստատիկ եղանակով, քանի որ ի տարբերություն լուծույթի բարձր իոնական ուժերի, ցածր իոնական ուժերի դեպքում  $\text{Na}^+$  իոնները ավելի քիչ են էկրանավորում ԴՆԹ-ի բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերը ՄԿ-ի դրական լիցքավորված մոլեկուլներից:

Լուծույթի ցածր իոնական ուժերի դեպքում ինտերկալյացիոն մեխանիզմի դրսևորման առավելությունը պայմանավորված է նաև այն հանգամանքով, որ այդ պայմաններում ԴՆԹ-ի մոլեկուլը ավելի քիչ է ոլորված, ինչը հեշտացնում է լիզանդի մոլեկուլի ներդրումը երկու հիմքերի զույգերի հարթությունների միջև:

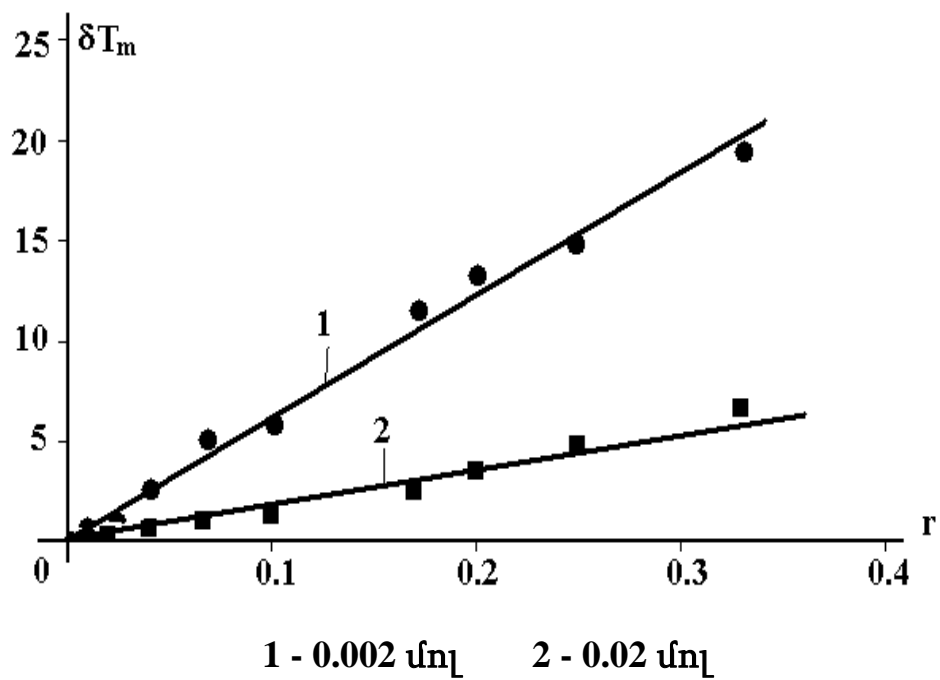


Նկ. 19 Մաքուր ԴՆԹ-ի (1) և ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսների (կոր 2 և 3) հավման կորերը  $r=լիզանդ/ԴՆԹ$  0,1 և 0,167 հարաբերության դեպքում: Լուծույթի իոնական ուժը՝ 0,02 մոլ,  $pH \approx 7,0$ :

Այլ է պատկերը 0,002 մոլ իոնական ուժում, քանի որ այդ պայմաններում ինտերկալյացիայի համար անհրաժեշտ է լրացուցիչ էներգիա՝ ԴՆԹ-ի ետ ոլորման, ինչպես նաև միմյանց նկատմամբ հարևան հիմքերի գույգերի՝ պարույրի երկարությամբ տեղաշարժի համար: Լուծույթի ցածր ջերմաստիճանների դեպքում դա թերմադինամիկորեն ցանկալի չէ, ուստի լիզանդի մոլեկուլները “պետք է” փոխազդեն ԴՆԹ-ի հետ այլ եղանակներով (էլեկտրաստատիկ և այլն), ինչի հետևանքով կոմպլեքսների նատիվ կառուցվածքի կայունացումն ունի ավելի փոքր արժեք, քան 0,002 մոլ իոնական ուժի դեպքում: Այդ տեսանկյունից, ավելի հավանական է դառնում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ կապման կիսաինտերկալյացիոն եղանակը, որը ցույց է տրված ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության դեպքում (տես [153]):

Այդ փաստի հավաստումը կարող է հանդիսանալ  $\delta\Delta T$  պարամետրը: Մասնավորապես, այդ պարամետրի կախումը  $r$ -ից, որը բերված է նկ.21-ում և ստացվել է լուծույթի 0,002 մոլ իոնական ուժի դեպքում (կոր 1)՝ զանգակաձև է, մինչդեռ 0,02 մոլ իոնական ուժում այդ կորն աճում է  $r$ -ի փոքր արժեքների դեպքում և հասնում է հազեցման՝ լիզանդի հարաբերականորեն մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում: Ինչպես երևում է բերված նկարից,  $r$ -ի փոքր արժեքների դեպքում երկու իոնական ուժերում էլ ( $0 < r \leq 0,1$ )  $\delta\Delta T$ -ն աճում է: ՄԿ-ի կոնցենտրացիայի հետագա մեծացմանը զուգընթաց ( $r$ -ի հարաբերականորեն մեծ արժեքների դեպքում)  $\delta\Delta T$ -ն լուծույթի 0,002 մոլ իոնական ուժի դեպքում ձեռք է բերում առավելագույն արժեք, որը չի փոխվում  $0,1 \leq r \leq 0,25$  միջակայքում, այնուհետև,  $r$ -ի հետագա մեծացման դեպքում  $\delta\Delta T$ -ն սկսում է նվազել, մինչդեռ 0,02 մոլ իոնական ուժի ժամանակ այդ պարամետրը  $r > 0,1$  արժեքներից սկսած այլևս չի փոխվում:  $r$ -ի փոքր արժեքների դեպքում  $\delta\Delta T$ -ի աճը պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ կոմպլեքսների հալմանը զուգընթաց ՄԿ-ի կապված մոլեկուլները վերաբաշխվում են ԴՆԹ-ի դենատուրացված (բնափոխված) հատվածներից դեռևս չդենատուրացված (չբնափոխված) հատվածների վրա: Այդ գործընթացը բերում է ԴՆԹ-ի մոլեկուլում նոր, կայունացված հատվածների առաջացմանը, ինչն, իր հերթին, հանգեցնում է ջերմաստիճանից կախված հալման պրոցեսի “ձգձգմանը”, այսինքն, ավելի շատ ջերմություն է ծախսվում կոմպլեքսների լրիվ դենատուրացման (բնափոխման) համար: Լիզանդի կոնցենտրացիայի մեծացման դեպքում ինտերկալյացիոն տեղամասերը հազեցնում են, ինչի հետևանքով դժվարանում է հալման





Նկար 20. ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների՝  $r=լիզանդ/ԴՆԹ$  հարաբերությունից հալման ջերմաստիճանի փոփոխության՝  $\delta T_m$ -ի կախվածության կորերը: Կոր 1-ը ստացվել է լուծույթի 0,002 մոլ, կոր 2-ը՝ 0,02 մոլ իոնական ուժի դեպքում:

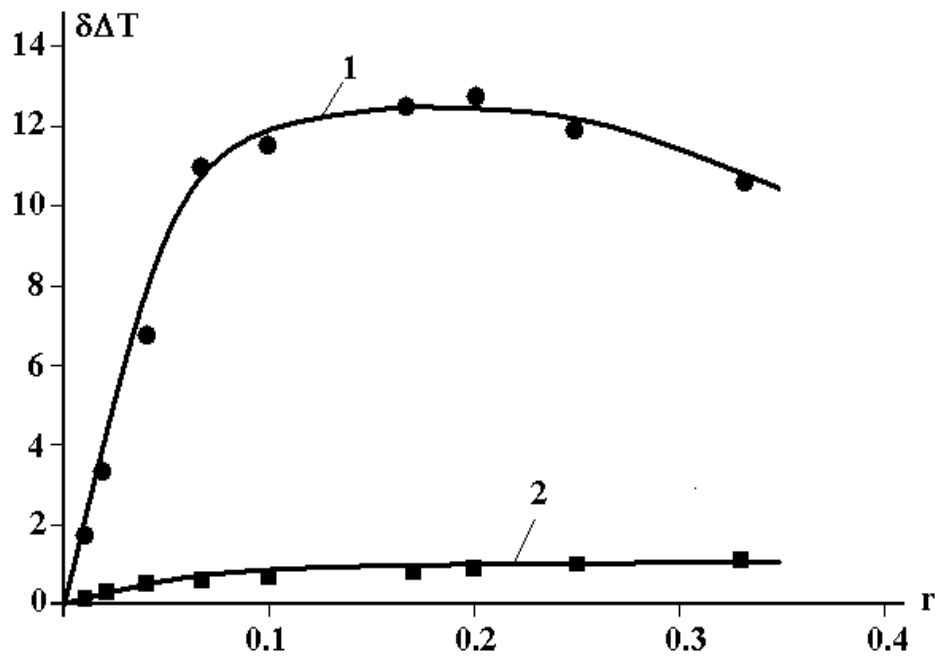
ընթացքում լիզանդի մոլեկուլների վերաբաշխումը (դադարում է  $r$ -ի մեծ արժեքների դեպքում) և  $\delta\Delta T$ -ն այդ պայմաններում մնում է հաստատուն: Այս վիճակը պահպանվում է լուծույթի 0,02 մոլ իոնական ուժի դեպքում, մինչդեռ 0,002 մոլ իոնական ուժում և  $r > 0,25$  արժեքների դեպքում  $\delta\Delta T$ -ն սկսում է նվազել:

Այս տվյալները գտնվում են համապատասխանության մեջ [139] աշխատանքում բերված արդյունքների հետ, որտեղ ցույց է տրված, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման դեպքում  $\delta\Delta T$ -ն աճում է  $r$ -ի հարաբերականորեն փոքր արժեքների դեպքում, այնուհետև, անցնելով մաքսիմումով, նվազում է՝ ստանալով զանգակաձև տեսք: ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի և ՄԿ-ի կոմպլեքսների համար ստացված  $r$ -ից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածության զանգակաձև կորերի նմանությունը, ինչպես նաև գրական տվյալները [139,145] վկայում են, որ լուծույթում նատրիումի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ը նույնպես կապվում է այն նույն եղանակներով, ինչ ԷԲ-ը, այսինքն՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ: Ընդ որում, չեն բացառվում նաև փոխազդեցության այլ եղանակներ:

Ներկայումս, բազմաթիվ ինտերկալյատորների համար, ինտերկալյացիայի հետ համատեղ, հայտնաբերված է նաև կապման մասնակի ինտերկալյացիայի (կիսաինտերկալյացիա) եղանակը, և փոխազդեցության այդ եղանակը հնարավոր է ինչպես միաշղթա, այնպես էլ երկշղթա ԴՆԹ-ում, ինչպես նաև սինթետիկ պոլիմուկլեոտիդներում [153, 154, 166]: Ընդ որում, երկշղթա ԴՆԹ-ի դեպքում կիսաինտերկալյացիան հնարավոր է միաժամանակ երկու շղթաներում: Հաշվի առնելով այս փաստը՝ մենք ենթադրում ենք, որ լուծույթի 0,002 մոլ իոնական ուժի դեպքում,  $0,1 < r \leq 0,25$  միջակայքում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ը, ինտերկալյացիային զուգընթաց, առաջացնում է նաև կիսաինտերկալյացիոն կոմպլեքսներ:

Հայտնի է, որ ԴՆԹ-ի հալման միջակայքը ( $\Delta T$  մեծությունը) հանդիսանում է վերջինիս կառուցվածքի հետերոգենության չափանիշը և որոշվում է  $\Delta T = T_{GC} - T_{AT}$  տարբերությամբ, ընդ որում, հոմոնուկլեոտիդների դեպքում (poly[d(A-T)] կամ poly[d(G-C)]) այդ մեծությունը հավասար է  $\sim 0,5 - 1^\circ\text{C}$ :

Հոմոպոլիմուկլեոտիդների ոչ զրոյական հալման միջակայքը պայմանավորված է դրանց մոլեկուլի երկայնքով հիմքերի զույգերի միջև ստեկինգ փոխազդեցության հետերոգենությամբ, ինչը բնական ԴՆԹ-ի դեպքում զգալի է (ընդհուպ մինչև  $13 - 15^\circ\text{C}$ )



1 - 0.002 մոլ      2 - 0.02 մոլ

Նկ. 21 ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ կոմպլեքսների՝  $r = \text{լիգանդ/ԴՆԹ}$  հարաբերությունից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածության կորերը: Կոր 1-ը ստացվել է լուծույթի 0.002 մոլ, կոր 2-ը՝ 0.02 մոլ իոնական ուժի դեպքում:

[8,159,160]: Այդ տեսանկյունից, լիզանդի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում կոմպլեքսների  $\Delta T$ -ի (ինչպես նաև  $\delta\Delta T$ ) նվազումը, ամենայն հավանականությամբ, կարող է պայմանավորված լինել ստեկինգ փոխազդեցությունների հետերոգենության փոփոխությամբ (քանի որ մնացած գործոնները, որոնցով պայմանավորված է հալման միջակայքի լայնությունը չեն փոփոխվում): Այս ամենը հաշվի առնելով, մենք ենթադրում ենք, որ կապման կիսաինտերկալյացիոն եղանակը, ի տարբերություն ինտերկալյացիոն եղանակի, նպաստում է ստեկինգ փոխազդեցությունների հետերոգենության նվազմանը:

Այս տեսանկյունից, լուծույթի 0,02 մոլ իոնական ուժի և լիզանդի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ կոմպլեքսների համար ստացված  $\delta\Delta T$  կախվածությունը  $r$ -ից պետք է նվազի: Փորձարարականորեն դա չի բացահայտվել, հետևաբար, մենք ենթադրում ենք, որ բարձր իոնական ուժերում ԴՆԹ-ի հետ կապման ոչ բոլոր եղանակներն են դրսևորվում: Հաշվի առնելով նաև վերջինիս կոմպակտ (խիտ) կառուցվածքը՝ մենք ենթադրում ենք, որ լուծույթի բարձր իոնական ուժերի դեպքում ավելի նախընտրելի են դառնում կապման էլեկտրաստատիկ և կիսաինտերկալյացիոն եղանակները, ընդ որում, լրիվ ինտերկալյացիայի բացակայության ժամանակ էլեկտրաստատիկ եղանակը էական դեր է կատարում ԴՆԹ-ի կայունացման գործում:

Մինևույն ժամանակ հայտնի է, որ հալման միջակայքի լայնության մեծությունը գրեթե կախվածություն չունի լուծույթի իոնական ուժից և հասնելով որոշակի արժեքի՝ այն հաստատուն է մնում ադի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում [160]: Հետևաբար, լիզանդի մեծ կոնցենտրացիաների և հարաբերականորեն բարձր իոնական ուժերի դեպքում ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների  $\delta\Delta T$ -ի մեծությունը մնում է հաստատուն, չնայած այն հանգամանքին, որ հալման ջերմաստիճանը այդ պայմաններում մեծանում է:

Հաշվի առնելով վերը նշվածը՝ մենք եզրակացնում ենք, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ը կարող է կապվել մի քանի եղանակներով, որոնց դրսևորումը կախված է լուծույթի իոնական ուժից: Մասնավորապես, 0,002 մոլ իոնական ուժի դեպքում դրսևորվում է կապման երեք եղանակ՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ, իսկ 0,02 մոլ իոնական ուժում՝ երկու՝ կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ:

Լուծույթի 0,02 մոլ իոնական ուժի դեպքում ինտերկալյացիոն եղանակի բացակայությունը նկատվում է նաև ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսների կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում, քանի որ ինչպես արդեն ցույց է տրվել, ԴՆԹ-ՄԿ

կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում դիտվում է ոչ մեծ հիպոքրոմիզմ, իսկ  $\Gamma$ -ի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում՝ կլանման սպեկտրների մաքսիմումների աննշան տեղաշարժ դեպի երկարալիք տիրույթ:

Բերված տվյալներից բացահայտվել է նաև, որ  $\text{Na}^+$  կոնցենտրացիան մեկ կարգով նվազեցնելիս՝ լիզանդի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց կոմպլեքսների հալման ջերմաստիճանը և հալման միջակայքի լայնությունը ձեռք են բերում ավելի մեծ արժեքներ, քան 0,02 մոլ իոնական ուժում: Ընդ որում, 0,002 մոլ իոնական ուժի դեպքում  $\delta\Delta T$ -ն գրեթե մեկ միավորով մեծ է, քան 0,02 մոլ իոնական ուժում: Այս երևույթը հետևանք է այն հանգամանքի, որ նշված իոնական ուժերում  $\Gamma$ -ն գտնվում է կառուցվածքային տարբեր վիճակներում, ուստի ՄԿ-ը կապվում է  $\Gamma$ -ի տարբեր կառուցվածքների հետ տարբեր եղանակներով (մեխանիզմներով), որն էլ, իր հերթին, անդրադառնում է թերմոդինամիկ պարամետրերի վրա:

### 3.4. ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կապման առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունը՝ կախված նուկլեոտիդային հաջորդականությունից

Վերջին տարիներին էական առաջընթաց է դիտվում օլիգոպեպտիդային հակաբիոտիկների և պեպտիդների կողմից ազոտային հիմքերի գույզերի հաջորդականությունների մոլեկուլային ճանաչման մեխանիզմների պարզաբանմանը վերաբերող հարցերում: Դա նոր հնարավորություններ է ընձեռում ընտրողաբար կապվող այնպիսի քիմիական միացությունների նախագծման և սինթեզի համար, որոնք իրենց այդ հատկությամբ կնմանվեն գենոմի նկատմամբ ընտրողականությամբ օժտված տարբեր արգելակիչներին և խթանիչներին: Քանի որ այս միացությունները կարող են սպեցիֆիկ ձևով ազդել բակտերիալ և էուկարիոտ բջիջների գեների ակտիվության վրա, ուստի դրանց սինթեզը կարևոր նշանակություն ունի մոլեկուլային կենսաբանության և դեղագիտության տեսանկյունից: Այս միացությունների նախագծման համար անհրաժեշտ է հաշվի առնել ԴՆԹ-ի եռաչափ կառուցվածքի առանձնահատկությունները, ինչպես նաև լիզանդների համար կապման կենտրոններ հանդիսացող ատոմային խմբերի քիմիական հատկությունները [184-192]:

“Ճանաչելու” կամ առավելապես ԴՆԹ-ի որոշակի հատվածներին (սայտերին) կապվելու ունակությունը հանդիսանում է ինչպես գենոմի ակտիվության կարգավորմանը մասնակցող սպիտակուցների, այնպես էլ որոշ ԴՆԹ-սպեցիֆիկ հակաբիոտիկների, գունանյութերի և այլ լիզանդների անբաժան հատկությունը:

Դրանց են պատկանում հակաուռուցքային հատկություններով օժտված հակաբիոտիկներ նետրոպսինը, դիստամիցին A-ն, Hoechst 33258 ֆլուորեսցենտային ներկանյութը, որոնք կապվում են հիմնականում ԴՆԹ-ի AT-հարուստ տեղամասերում [2,167]: Գոյություն ունեն նաև GC-սպեցիֆիկ լիզանդներ, հիմնականում ինտերկալատորներ՝ ակտինոմիցին Դ (ԱՄԴ), միտոքսանտրոն, ամետանտրոն և այլն: Կարևոր է նշել, որ ի տարբերություն ԴՆԹ-ի AT-հարուստ տեղամասերի նկատմամբ որոշ լիզանդների ընտրողականության, նետրոպսինի, դիստամիցինի կամ Hoechst-ի դեպքում AT-սպեցիֆիկությունը չի ճնշվում բարձր իոնական ուժերի ազդեցությամբ (ընդհուպ մինչև NaCl 1 մոլ և ավելի մեծ կոնցենտրացիաների) [2]:

Կարգավորիչ սպիտակուցների առավել հետաքրքրություն ներկայացնող հասկություններից է ԴՆԹ-ի որոշակի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների “ճանաչողության” ունակությունը: Այլ սպիտակուցներ և բազմաթիվ փոքր մոլեկուլներ փոխազդում են ԴՆԹ-ի հետ ոչ սպեցիֆիկորեն կամ խնամակցություն են ցուցաբերում հիմնականում միայն մեկ տիպի հիմքերի զույգերի նկատմամբ:

Տիզիկական այն մոդելի ընտրությունը, որը համապատասխան ձևով կնկարագրի ԴՆԹ-ի հիմքերի զույգերի որոշակի հաջորդականությունների հետ լիզանդների ընտրողական կապման մոլեկուլային մեխանիզմը, հիմնվում է հետևյալ պատկերացումների համակցությունների վրա. հիմքերի զույգերի հաջորդականությունը պայմանավորում է կրկնակի պարույրի կառուցվածքի այնպիսի փոփոխությունները (նույնիսկ եզակի, խաչաձև կառուցվածքների առաջացումը), որոնք կոմպլեմենտար են համապատասխան լիզանդների կոնֆորմացիաներին, կամ լիզանդի մոլեկուլն անմիջականորեն “ճանաչում” է ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը՝ հիմքերի տարբեր ֆունկցիոնալ խմբերի հետ փոխազդեցության շնորհիվ: ԴՆԹ-ի հետ նետրոպսինի կապման առաջին փորձերի արդյունքները բացահայտում են, որ երկրորդ պատկերացումն ավելի նախընտրելի է: Այդ փորձերում ցույց է տրվել, որ A-ԴՆԹ-ն նետրոպսինի ազդեցության տակ ենթարկվում է  $A \rightarrow B$  կոնֆորմացիոն փոխարկման, քանի որ այդ լիզանդը կապվում է միայն ԴՆԹի B-ձևի հետ: Այս արդյունքը հստակ ցույց է տալիս, որ ԴՆԹ-ի հետ լիզանդի մոլեկուլների փոխազդեցության էներգիան կարող է շատ ավելի մեծ լինել ԴՆԹ-ի տարբեր ձևերին համապատասխանող էներգիաների տարբերություններից: Այդ էներգիան կարող է ավելի մեծ լինել ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիայի տեղային փոփոխությունների միջև այն էներգետիկ տարբերություններից, որոնք կապման տեղամասերում տրվում են հիմքերի զույգերի հաջորդականությամբ: Որպես օրինակ կարող են ծառայել ԴՆԹ-ի հետ նետրոպսին և դիստամիցին A հակաբիոտիկների կոմպլեքսները, քանի որ այդ լիզանդների մոլեկուլները կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում՝ ջրածնական կապերի միջոցով, որոնք առաջանում են հակաբիոտիկի N-մեթիլպիրոլկարբոքսամիդային կմախքի NH-խմբերի և ԴՆԹ-ի AT-զույգերի միջև [2]:

Հարկ է նշել, որ կենսաբանորեն ակտիվ, ցածրամոլեկուլային միացությունների մեծ մասը կարող է ԴՆԹ-ի հետ կապվել տարբեր եղանակներով: Կապման այս կամ այն

եղանակի ի հայտ գալը կախված է ոչ միայն լիզանդի կոնցենտրացիայից, ինչպես դա ցույց է տրվել վերևում, այլև հենց ԴՆԹ-ի կառուցվածքից՝ նուկլեոտիդային հաջորդականությունից, հիդրատացման աստիճանից կամ նրա տարբեր տեղամասերի կազմավորման այլ առանձնահատկություններից: Մասնավորապես, վերը նշված լիզանդների հետ մեկտեղ որոշակի սպեցիֆիկություն հայտնաբերված է նաև դասական ինտերկալյատոր ԷԲ-ի համար, որը ինտերկալյացիայի դեպքում ընտրողաբար կապվում է ԴՆԹ-ի 3՝-պիրիմիդին-5՝-պուրին հաջորդականությունների հետ: Միննույն ժամանակ այս լիզանդը, բացի ինտերկալյացիայից, ԴՆԹ-ի հետ կապվում է նաև կիսաինտերկալյացիոն եղանակով, որը ևս հանդիսանում է սայտ-սպեցիֆիկ [153]:



3.4.1. GC/AT հարաբերության ազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի, ԷԲ-ի և H33258-ի փոխազդեցության վրա

ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը ուսումնասիրվել է կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրասկոպիաների մեթոդներով և ԴՆԹ-ԷԲ համապատասխան սպեկտրների վերլուծությունից ստացվել են  $r$  և  $C_f$  կոորդինատները: ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման դեպքում տեղի ունի վերջինիս մոլեկուլների լիցքի խտության բաշխման փոփոխություն, որը պայմանավորում է առաջացող կոմպլեքսների սպեկտրների առանձնահատկությունները: Մասնավորապես, կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների մաքսիմումները նվազում են և տեղաշարժվում երկարալիքային տիրույթ՝ ազատ լիզանդի կլանման սպեկտրի համեմատ, միևնույն ժամանակ, ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունն աճում է:

Այս մեթոդների առանձին կիրառման դեպքում հնարավոր չէ որոշել, թե որոշակի պայմաններում (իոնական ուժ, լուծույթի pH, ԷԲ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերություն, ԴՆԹ-ի միջին GC-պարունակություն) որ եղանակով է ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն, թե արտաքին, լիզանդը կապվել ԴՆԹ-ի հետ, քանի որ բոլոր այս եղանակները գործնականում միանման փոփոխություններ են հրահրում կլանման սպեկտրներում: Սյուս կողմից ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճը պայմանավորված է կապման ինտերկալյացիոն եղանակով [152]: Հետևաբար, վերը նշված մեթոդների համակցումը ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրության դեպքում կարող է ավելի ինֆորմատիվ լինել և բացահայտել կապման նոր եղանակներ, որոնք շատ հաճախ քողարկվում են՝ միայն մեկ մեթոդով ուսումնասիրության դեպքում:

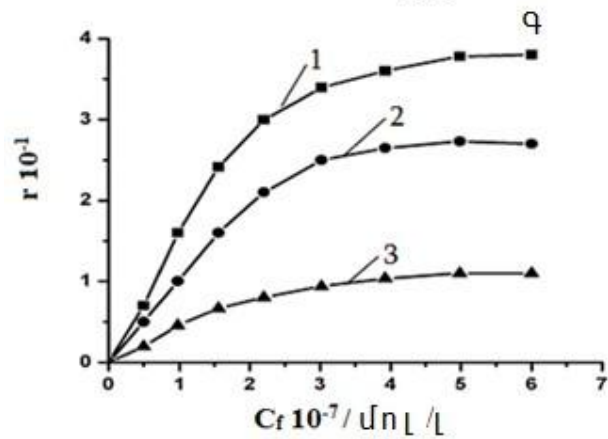
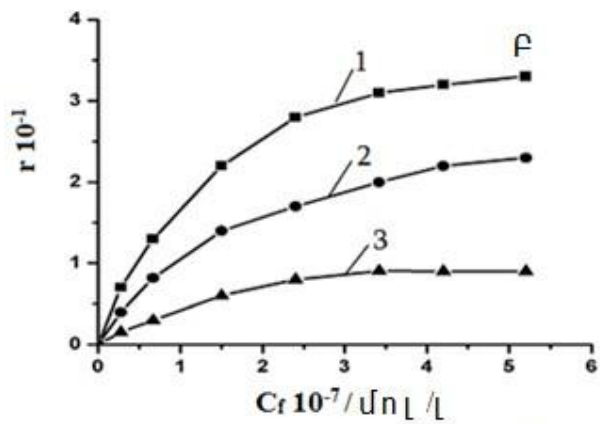
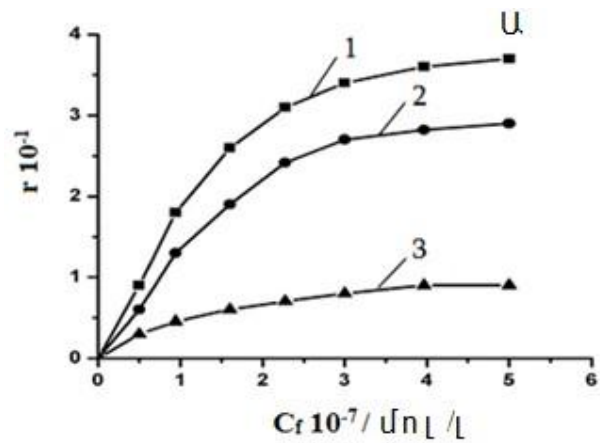
Ավելի վաղ ցույց էր տրվել, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ն առաջացնում է երկու տիպի կոմպլեքսներ՝ “ուժեղ” և “թույլ”: Հետագա ուսումնասիրությունները բացահայտել են, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ կարող է կապվել առնվազն երկու “ուժեղ” եղանակներով [148,153,171,172]: Ավելին, ցույց է տրվել, որ ԷԲ-ն կարող է տեղակայվել ԴՆԹ-ի մեծ ակոսում և առաջացնել ջրածնական կապեր ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկի պուրինային հիմքերի հետ [169]: Ավելի հետաքրքիր է այն, որ ԷԲ-ը և՛ միաշղթա ԴՆԹ-ի, և՛ միաշղթա պոլինուկլեոտիդների հետ կապվում է առնվազն երկու եղանակներով՝ “ուժեղ” և “թույլ”,

ընդ որում, ուժեղ եղանակը համապատասխանում է կիսահնտերկայացիային [153,154]: Ցույց է տրվել որ, ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ առաջացնում է ուժեղ տիպի կոմպլեքսներ, որոնցից մեկի դեպքում գրանցվում է ֆլուորեսցենցիա, մյուսի դեպքում չի գրանցվում [164,171]: Ինչպես վերևում նշվել է, ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճը պայմանավորված է ԴՆԹ-ի հիմքերի զույգերի հարթությունների մեջ լիզանդի մոլեկուլների ինտերկալյացիայով, իսկ մյուս տիպի, ֆլուորեսցենցիա չդրսևորող, ուժեղ կոմպլեքսը համապատասխանում է կիսահնտերկայացիոն եղանակին, քանի որ այս դեպքում ԷԲ-ի կապված մոլեկուլները դառնում են մատչելի ջրի մոլեկուլների համար, ինչի արդյունքում տեղի է ունենում ֆլուորեսցենցիայի մարում: Փոխազդեցության այս տիպը հիմնականում առաջանում է  $r < 0.25$  ( $r = C_b / C_p$ ) արժեքների դեպքում, այսինքն լիզանդի հարաբերականորեն փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում:

Ցույց է տրվել, որ ԷԲ-ի մոլեկուլների կիսահնտերկայացիան տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի հարաբերականորեն GC հարուստ տեղամասերում [170]: Կապման կիսահնտերկայացիոն եղանակի վրա այս գործոնի ազդեցության բացահայտման նպատակով իրականացվել են հետազոտություններ կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով և համապատասխան սպեկտրների հիման վրա ստացվել են  $r$  և  $C_f$  արժեքները (ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի հետ նրա կոմպլեքսների կլանման, ինչպես նաև ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների վարքը կախված չէ նուկլեինաթթվի միջին GC-պարունակությունից, ընդ որում, դրանք համընկել են աշխատանք [152]-ում ստացված համապատասխան սպեկտրների հետ, ուստի այս աշխատանքում չեն ներկայացվել): Նկ. 22-ում բերված են  $r$ -ի կախվածությունները  $C_f$ -ից, որոնք ստացված են Cl. Perfr. (U), հորթի թիմուսի (F) և M. lysod. (G) ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության դեպքում: 1 կորերը ստացված են կլանման, 2-րդ կորերը՝ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա: Բերված նկարից երևում է, որ 1 և 2 կորերը շեղված են իրարից, այսինքն՝ քանակապես  $r_{կլ}$ -ը ( $r$ -ի արժեքը՝ ստացված կլանման սպեկտրների հիման վրա) և  $r_{ֆլուոր}$ -ը ( $r$ -ի արժեքը՝ ստացված ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա) տարբերվում են: Կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդով գրանցվում են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի բոլոր հնարավոր կապման եղանակները (ինչի արդյունքում Սկետչարդի կոորդինատներով կապման կորը ոչ գծային է), մինչդեռ ֆլուորեսցենտային սպեկտրասկոպիայի մեթոդով գրանցվում է միայն մեկ եղանակ, հետևաբար, այս տարբերությունը պայմանավորված է

ևս մեկ տիպի կոմպլեքսի գոյությամբ, որի դեպքում ֆլուորեսցենցիա չի գրանցվում: 1-ին և 2-րդ կորերի տարբերությունից ստացվում են 3 կորերը: Այս կորերից հաշվարկվել են նշված ԴՆԹ-ների հետ ԷԲ-ի կապման հաստատունի՝  $K$ -ի և կապման տեղերի թվի՝  $n$ -ի արժեքները, որոնք համախմբված են աղյուսակ 3-ում: Ստացված տվյալներից երևում է, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման պարամետրերը գործնականում կախված չեն միջին GC-պարունակությունից: Ընդ որում, բակտերիալ ԴՆԹ-ի դեպքում (Cl. Perfr. և M. lysod.), ուժեղ, հետ չլուսարձակող կոմպլեքսների կապման հաստատունների արժեքները գրեթե նույնն են ( $K=0,8 \cdot 10^5 M^{-1}$ ), մինչդեռ հորթի ուրցագեղձի ԴՆԹ-ի դեպքում այս պարամետրի արժեքն ավելի մեծ է ( $K=1,2 \cdot 10^5 M^{-1}$ ): Ամենայն հավանականությամբ, դա պայմանավորված է նրանով, որ հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ն ունի տարբեր GC-պարունակությամբ բլոկային կառուցվածք, իսկ բակտերիալ ԴՆԹ-ում կարող են պարունակվել երկարաձգված AT և GC կլաստերներ, որոնց կառուցվածքն էականորեն այլ է, քան նուկլեոտիդային գույգերի պատահական բաշխվածությամբ բլոկներինը:

Հայտնի է, որ նուկլեոտիդային հաջորդականությունը պայմանավորում է ԴՆԹ-ի ակոսների լայնությունը և թույլ ուժերի ներդրումը այդ ակոսների երկրաչափության կայունացման և հիդրատացման աստիճանի մեջ, ինչն, իր հերթին, որոշիչ է ԴՆԹ-ի մեծ կամ փոքր ակոսում լիզանդի կապման և որոշակի հիմքերի գույգերի նկատմամբ սպեցիֆիկության համար [8,167]: Այնուամենայնիվ, ինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում  $K$  արժեքները գործնականում համընկնում են միմյանց հետ, համընկնում են նաև կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում: Ինտերկալյացիոն մեխանիզմով կապման դեպքում որոշիչ է էնթրոպիական գործոնը, քանի որ վերջինիս մեջ հիմնական ներդրումն ունեն լիզանդի մոլեկուլների արոմատիկ խմբերի և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի միջև հիդրոֆոբ փոխազդեցությունները՝ անկախ հիմքերի տիպից [8]: Հետևաբար, ԷԲ-ի ինտերկալյացիան AT-AT, AT-GC, GC-GC գույգերի հարթությունների մեջ գործնականում խոչընդոտներ չունի և միակ պայմանն այն է, որ ԴՆԹ-ի պարույրի երկայնքով պահպանվի նուկլեոտիդների 3'-պիրիմիդին-5'-պուրին հաջորդականությունը [5,53]: Բնական է ենթադրել, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման կիսաինտերկալյացիոն եղանակի դեպքում որոշակի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների նկատմամբ սպեցիֆիկություն չպետք է դրսևորվի, ինչը և ստացվել է մեր կողմից:



Նկար 22. *Cl. Perfr.* (U), *հորթի ուրցագեղձի* (F) և *M. lysod.* (Q) ԴՆԹ-ի հետ *ԷԲ*-ի կապման կորերը 0,02 M իոնական ուժի դեպքում, pH=6,9,  $t=25^{\circ}\text{C}$ : 1 կորերը ստացվել են կոմպլեքսների կլանման, 2 կորերը՝ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա, 3 կորերը՝ 1 և 2 կորերի տարբերության միջոցով:

Այլ է իրավիճակը մյուս պարամետրի՝  $n$ -ի դեպքում: Ինչպես երևում է աղյուսակային տվյալներից, կիսահինտերկայացիոն եղանակով կապման դեպքում, ԴՆԹ-ի միջին GC-պարունակության աճին զուգընթաց  $n$ -ի արժեքը նվազում է, մինչդեռ ինտերկայացիոն եղանակով կապման դեպքում  $n$ -ը կախված չէ ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունից: Նկ. 23-ում բերված է ԴՆԹ-ի միջին GC-պարունակությունից  $n$ -ի կախվածության կորը՝ կիսահինտերկայացիոն եղանակով կապման դեպքում: Այդ կախվածությունը մոնոտոն նվազում է GC-պարունակության աճին զուգընթաց, ինչը ի հայտ է բերում ԷԲ-ի որոշակի ընտրողականություն GC-զույգերի նկատմամբ՝ կիսահինտերկայացիոն եղանակով կապման դեպքում, քանի որ  $GC=100\%$  արժեք այս կախվածության արտարկման դեպքում (էքստրապոլյացիա)  $n \approx 3$  (ԷԲ-ի մոլեկուլի կապման մեկ տեղին համապատասխանում է երեք նուկլեոտիդային զույգ):

Ամենայն հավանականությամբ, ԴՆԹ-ի AT-հաջորդականություններն ունեն ավելի “կոշտ” կառուցվածք և ավելի հիդրատացված են, քան GC տեղամասերը [8]: Այս մասին են վկայում նաև [164,171] աշխատանքներում ստացված արդյունքները, որտեղ ցույց է տրված, որ poly(dA)-poly(dT) սինթետիկ պոլիմուկլեոտիդի հետ ԷԲ-ի կապման ինտերկայացիոն եղանակով փոխազդեցությունը տեղի է ունենում կոոպերատիվորեն, մինչդեռ բնական ԴՆԹ-ների դեպքում ինտերկայացիայի պրոցեսը ոչ կոոպերատիվ է: Ակնհայտ է, որ կառուցվածքային կոշտությունը և հիդրատացման բարձր աստիճանը կարող են սահմանափակել ԷԲ-ի կապման տեղերի թիվը AT-հարուստ հատվածներում [164,171]:

Այսպիսով, մեր կողմից ստացված տվյալները վկայում են, որ ԴՆԹ-ում, ինտերկայացիայի դեպքում ԷԲ-ն չի ցուցաբերում սպեցիֆիկություն որոշակի նուկլեոտիդային զույգերի նկատմամբ, մինչդեռ կիսահինտերկայացիոն եղանակի դեպքում նուկլեոտիդային հաջորդականությունը կարևոր դեր է կատարում կապման այդ տեղամասերի հագեցման համար, չնայած այն հանգամանքին, որ կապման հաստատունի արժեքը կախված չէ նուկլեոտիդային պարունակությունից:

Ինչպես արդեն նշվել էր, գրական տվյալները վկայում են այն մասին, որ ՄԿ-ը ևս ԴՆԹ-ի հետ կապվում է տարբեր եղանակներով՝ կախված վերջինիս նուկլեոտիդային հաջորդականությունից: Աշխատանք [66]-ում քննարկվում է այս լիգանդի AT-

Տարբեր GC-պարունակությամբ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կապման հաստատունի՝ K-ի և կապման տեղերի թվի՝ n-ի արժեքները 0,02 M իոնական ուժում, pH=6,9, t=25°C

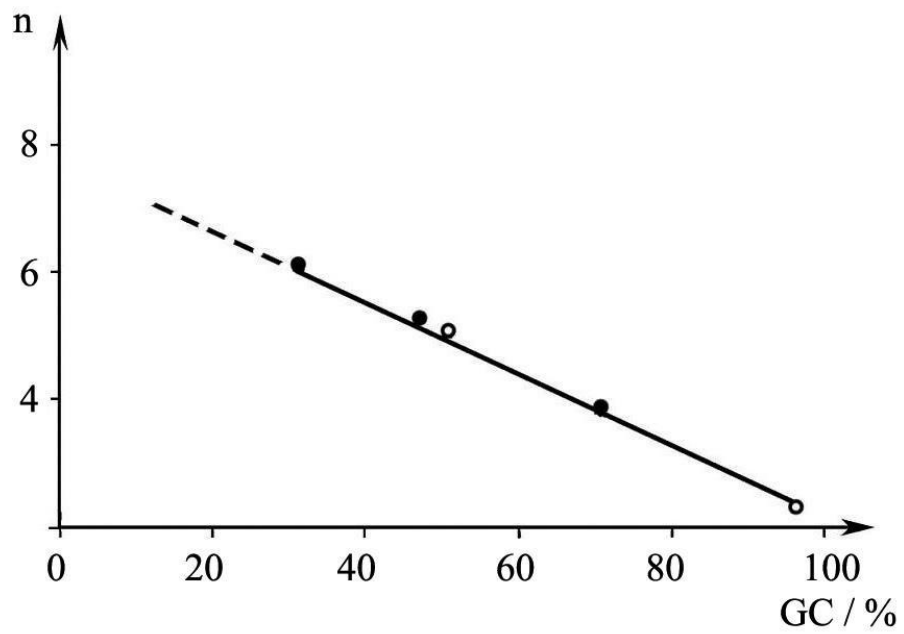
Կոմպլեքսի տիպը	Clostridium perfringens-ի ԴՆԹ 32%		Հորթի թիմուսի ԴՆԹ 42%		Micrococcus lysodeikticus-ի ԴՆԹ 72%	
	K·10 <sup>-5</sup> , M <sup>-1</sup>	n	K·10 <sup>-5</sup> , M <sup>-1</sup>	n	K·10 <sup>-5</sup> , M <sup>-1</sup>	n
Ուժեղ	4.8±0.04	1.3±0.2	5.1±0.05	1.5±0.1	4.7±0.04	1.4±0.1
Ուժեղ, հետ լուսարձակող	4.5±0.04	2.2±0.1	4.2±0.03	2.2±0.1	4.0±0.01	2.0±0.1
Ուժեղ, հետ չլուսարձակող	0.8±0.05	6.3±0.2	1.2±0.05	5.5±0.3	0.8±0.01	4.0±0.8

սպեցիֆիկությունը աղի հարաբերականորեն բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում, մինչդեռ դրա ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում հիմնական է դառնում ինտերկալյացիան: ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների հալման ուսումնասիրություններից ստացված տվյալները հաստատում են լուծույթի ցածր իոնական ուժերի դեպքում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման ինտերկալյացիոն եղանակի մասին եզրահանգումները: Միննույն ժամանակ, աղի հարաբերականորեն բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում ստացված տվյալները չեն հայտնաբերում AT-սպեցիֆիկ կապում:

Մասնավորապես, r-ից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածության 2 կորը, որը բերված է նկ. 20-ում, չի կարելի բացատրել ԴՆԹ-ի AT-հաջորդականությունների նկատմամբ ՄԿ-ի սպեցիֆիկության տեսանկյունից, քանի որ այս դեպքում այդ կախվածությունը պետք է նվազեր, ընդունելով բացասական արժեքներ, ինչպես դա տեղի ունի ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի կապման դեպքում:

H33258-ը ԴՆԹ-ի հետ սպեցիֆիկ կապվող լիգանդների տիպիկ ներկայացուցիչներից է, որը տեղակայվում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում և վերջինիս AT-հաջորդականությունների հետ առաջացնում է ջրածնական կապեր: Ավելի վաղ ցույց էր տրված, որ ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնության փոփոխությունը՝  $\delta\Delta T$ -ն, 0,02 մոլ իոնական ուժի դեպքում, r-ի աճին զուգընթաց նվազում է՝ ընդունելով բացասական արժեքներ [167]:

Այդ փաստը ակնառու դարձնելու նպատակով նկ. 24-ում բերված են r-ից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածության կորերը ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսների համար լուծույթի 0,02 մոլ (կոր 1) և 0,002 մոլ (կոր 2) իոնական ուժերի դեպքում: r-ից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածության բացասական փոփոխությունը AT սպեցիֆիկության հետևանք է, քանի որ, կապվելով այդ հաջորդականությունների հետ, H33258-ը բարձրացնում է դրանց հալման ջերմաստիճանը, մինչդեռ GC-հաջորդականությունների հալման ջերմաստիճանը գործնականում մնում է անփոփոխ: Հայտնի է, որ բնական ԴՆԹ-ների  $\Delta T$ -ի մեծ արժեքը պայմանավորված է AT-AT, AT-GC և GC-GC զույգերի միջև ստեկինգ փոխազդեցությունների էներգիայով, որը փոխվում է հետևյալ կերպ.  $E_{AT-AT} < E_{AT-GC} < E_{GC-GC}$ : Մյուս կողմից,  $\Delta T$ -ն իրենից ներկայացնում է  $T_{GC-TAT}$ , որտեղ  $T_{GC}$ -ն և  $T_{AT}$ -ն միայն GC և AT հաջորդականությունների հալման ջերմաստիճաններն են [5,32]: Հաշվի առնելով այս



Նկար 23. n-ի կախվածությունը ԴՆԹ-ի միջին GC-պարունակությունից՝  
 ԷԲ-ի կիսահնտերկայացիոն եղանակով կապման դեպքում:



փաստը՝ ակնհայտ է դառնում, որ  $T_{GC}$ -ի անփոփոխ արժեքի և  $T_{AT}$ -ի աճի դեպքում  $\Delta T$ -ն պետք է նվազի, ինչի արդյունքում  $\delta\Delta T$ -ն դառնում է բացասական: Բերված նկարից երևում է, որ 0,002 M իոնական ուժի դեպքում  $r$ -ից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածությունն (կոր 2) աճում է  $0 < r \leq 0,1$  միջակայքում, այնուհետև  $r$ -ի հետագա մեծացման դեպքում այդ կորը գործնականում մնում է անփոփոխ:

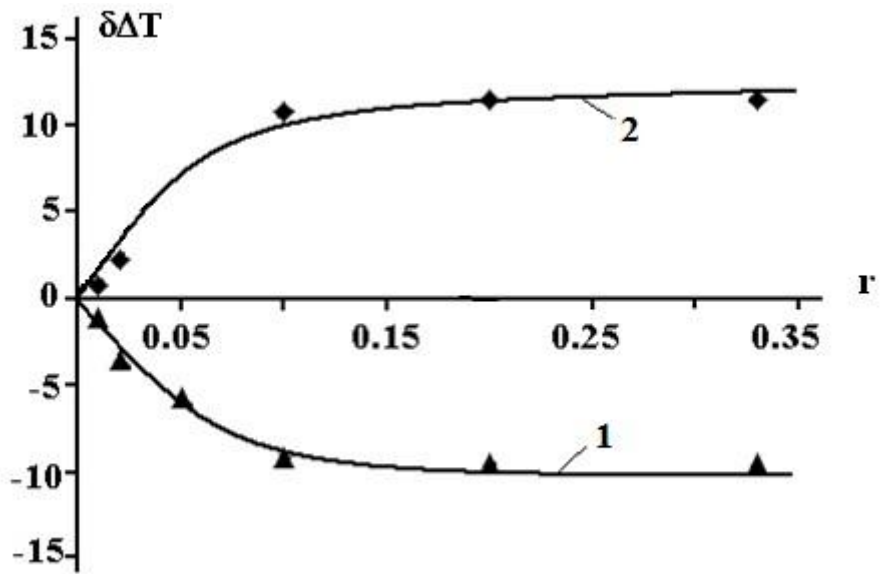
Հատկանշական է, որ կոր 1-ը, նվազելով  $0 < r \leq 0,1$  միջակայքում,  $r$ -ի աճին զուգընթաց այլևս չի փոխվում: Այս փաստը վկայում է այն մասին, որ լուծույթի նշված իոնական ուժերի դեպքում ԴՆԹ-ի վրա գոյություն ունեն H33258-ի կապման երկու տիպի տեղամասեր, որոնցից մեկը հազենում է  $r \approx 0,1$  արժեքների դեպքում (AT տեղամասեր), մյուսը՝ գործնականում չի հազենում  $0,1 < r \leq 0,35$  միջակայքում:

Վերջին դեպքում լիզանդի մոլեկուլները կապվում են ԴՆԹ-ի ֆոսֆատային խմբերին էլեկտրաստատիկ եղանակով: Այս տեղերը անսահմանափակ են ընդհուպ մինչև 1:1 հազեցման ստեխիոմետրիան և հանդիսանում են կապման կենտրոններ 0,002 մոլ և 0,02 մոլ իոնական ուժերի դեպքում:

ԴՆԹ-ի վրա H33258-ի կապման երկու տիպի տեղերի գոյությունը հաստատվում է նաև նրանով, որ կոմպլեքսների հալման ջերմաստիճանի փոփոխությունը՝  $\delta T_m$ -ը, աճում է  $0 < r \leq 0,35$  միջակայքում [167], քանի որ AT-սպեցիֆիկության և էլեկտրաստատիկ եղանակով կապման դեպքում ԴՆԹ-ի նատիվ կառուցվածքը կայունանում է, ինչի արդյունքում կոմպլեքսները հալվում են ավելի բարձր ջերմաստիճաններում:

Այսպիսով, ԷԲ-ի դեպքում կապման կիսաինտերկալյացիոն եղանակի ժամանակ ի հայտ է գալիս սպեցիֆիկություն ԴՆԹ-ի GC-հաջորդականությունների նկատմամբ, իսկ H33258-ի դեպքում՝ AT-սպեցիֆիկություն, լուծույթի հարաբերականորեն բարձր իոնական ուժերում, քանի որ ցածր իոնական ուժերի դեպքում՝  $\mu \leq 0,002$ , այսպիսի սպեցիֆիկություն չի հայտնաբերվում: Ընդ որում, չի բացառվում ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի կապման ինտերկալյացիոն եղանակի հնարավորությունը (գերազանցապես GC-հարուստ հատվածներում) [167]:

Այս արդյունքները համեմատելով ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների համար ստացված տվյալների հետ՝ մենք ենթադրում ենք, որ այս լիզանդը ևս սպեցիֆիկություն է ցուցաբերում ԴՆԹ-ի որոշակի հաջորդականությունների նկատմամբ: Մյուս կողմից, մեր



Նկար 24. ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսների՝  $r$ -ից  $\Delta T$ -ի կախվածության կորերը լուծույթի 0,02 (1) և 0,002 (2) մոլ իոնական ուժի դեպքում:

ստացած տվյալները վկայում են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման մի քանի՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակների գոյության մասին՝ լուծույթի ցածր իոնական ուժերում:

Լուծույթի ավելի բարձր իոնական ուժերում այս լիզանդի կապման ոչ բոլոր ձևերն են դրսևորվում, մասնավորապես, ամբողջական ինտերկալյացիան դառնում է թերմոդինամիկորեն ոչ ձեռնտու: Մյուս կողմից, չի դիտվում ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակների որակական փոփոխություն լուծույթի 0,02 M իոնական ուժի դեպքում, ինչպես դա տեղի ունի H33258-ի դեպքում: Անհրաժեշտ է նշել, որ մեր ստացած արդյունքները, այնուամենայնիվ, չեն հակասում գրականության մեջ գոյություն ունեցող տվյալներին:

Այսպես, նկ. 6-ում (Գլուխ 1) բերված են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության տարբեր մեխանիզմներ՝ ինտերկալյացիոն և ոչ ինտերկալյացիոն կապում փոքր և մեծ ակոսներում:

Առանձնահատուկ հետաքրքրություն են ներկայացնում Գ և Դ կոմպլեքսները, որոնցում ՄԿ-ի մոլեկուլները տեղակայված են ԴՆԹ-ի ակոսներում: Բացառված չի, որ այս կոմպլեքսները կայունանում են լիզանդի արոմատիկ օղակների և ազոտային հիմքերի միջև ստեղծված կապերի հաշվին, ինչի օգտին են վկայում էներգետիկ հաշվարկները, որոնք բացահայտել են ոչ մեծ տարբերություն ինտերկալյացիոն (Ա և Բ) և ոչ ինտերկալյացիոն (Գ և Դ) կոմպլեքսների միջև [66]:

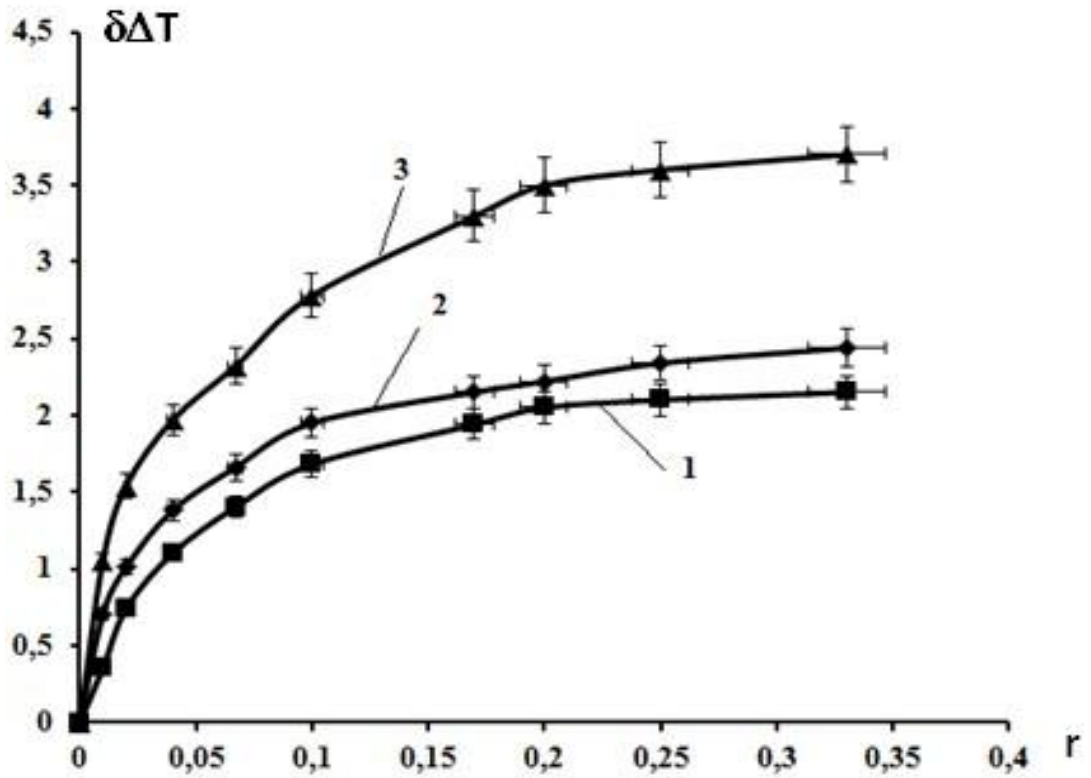
### 3.4.2. GC-պարունակության ազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ մեթիլեն կապույտի կապման վրա

ԴՆԹ-ի որոշակի հաջորդականությունների նկատմամբ ՄԿ-ի սպեցիֆիկության բացահայտման համար իրականացվել են տարբեր GC-պարունակությամբ ԴՆԹ-ների հետ այդ լիզանդի փոխազդեցության հետազոտություններ հալման մեթոդով: Նկ. 25-ում բերված են ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնության  $\delta\Delta T$ -ի ( $\delta\Delta T = \Delta T - \Delta_0 T$ , որտեղ  $\Delta T$ -ն և  $\Delta_0 T$ -ն համապատասխանաբար ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների և ԴՆԹ-ի հալման միջակայքի լայնության մեծություններն են) փոփոխության կախվածությունները  $r$ -ից ( $r = [\text{լիզանդ}]/[\text{ԴՆԹ}]$ )՝ լուծույթի 0,02 մոլ իոնական ուժի դեպքում:  $\Delta T$ -ի արժեքները ստացվել են հալման կորերից (համանման կորեր ներկայացված են վերևում, ուստի բերված չեն): Այս պարամետրը լիզանդի սպեցիֆիկության հավաստի ցուցանիշ է՝ ԴՆԹ-ի որոշակի տիպի հաջորդականությունների նկատմամբ [172]:

Ինչպես երևում է բերված նկարից, *Cl.perfr.* ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնության փոփոխությունը (կոր 1) ավելի փոքր է, քան հորթի ուրցագեղձի և *M. lysod.* ԴՆԹ-ների դեպքում: Մյուս կողմից, բոլոր դեպքերում  $\delta\Delta T$ -ի արժեքները դրական են, ինչը վկայում է այն մասին, որ այս լիզանդը չի ցուցաբերում AT-սպեցիֆիկություն, ինչպես *Hoechst 33258*-ը [167]: Միևնույն ժամանակ, ինչպես երևում է բերված նկարից, *M. lysod.* ԴՆԹ-ի դեպքում  $\delta\Delta T$ -ի աճն ավելի մեծ է, ինչը, ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է ԴՆԹ-ի GC-հաջորդականությունների հետ ՄԿ-ի նախընտրելի կապմամբ:

Ինչպես վերը ցույց է տրվել, 0,02 մոլ իոնական ուժով լուծույթում հորթի ուրցագեղձի ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ը կապվում է կիսահետերկայացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով:

Համեմատության համար մեր կողմից ստացվել են համանման կորեր ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների համար, որոնք բերված են նկ. 26-ում: Ինչպես երևում է բերված նկարից,  $r$ -ից  $\delta\Delta T$ -ի կախվածության կորերը լուծույթի 0,02 մոլ իոնական ուժի դեպքում զանգակաձև են: Դա հետևանք է այն բանի, որ այս պայմաններում ի հայտ է գալիս նաև ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման ինտերկալացիոն եղանակը:



Նկար 25. Տարբեր GC-պարունակությամբ (Cl. Perfr. 32%) (1), (հորթի ուրցագեղձի 42%) (2) և (M. lysod. 72%) (3) ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնության փոփոխության  $\Delta\Delta T$ -ի կախվածությունը  $r$ -ից՝ լուծույթի 0.02 M իոնական ուժի դեպքում:

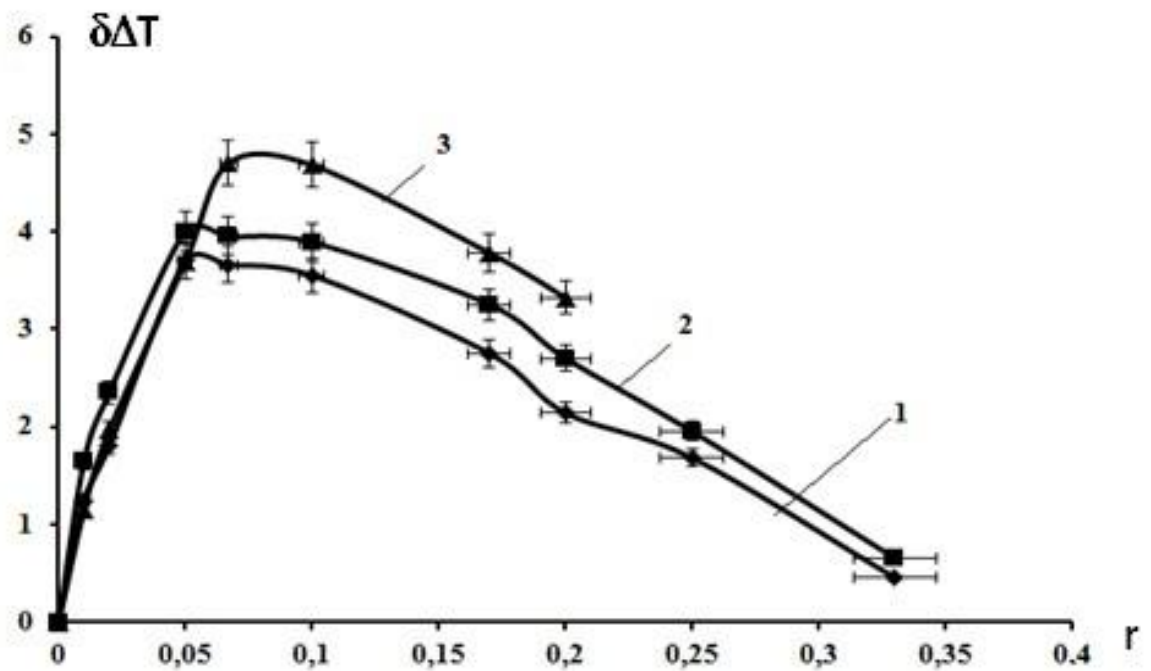
Ընդ որում,  $r$ -ից կախված՝  $\delta\Delta T$ -ի արժեքները  $E$ -ի դեպքում ևս ցուցաբերում են աճի միտում՝  $\Gamma$ -ում միջին GC-պարունակությունից կախված: Հարկ է նշել, որ M. lysod.  $\Gamma$ -ի հետ  $E$ -ի կոմպլեքսները,  $r > 0.2$  արժեքների դեպքում, ամբողջությամբ չեն հալվում ընդհուպ մինչև  $t = 98^\circ\text{C}$  (ավելի բարձր ջերմաստիճանների դեպքում լուծույթները կյուվետներում սկսում են եռալ, ուստի,  $t = 98^\circ\text{C}$ -ից վերև ջերմաստիճանը չի բարձրացվել), ինչի արդյունքում կետերը կոր 3-ի վրա (նկ. 26) ստացվել են մինչև  $E/\Gamma = 1/5$  հարաբերությունը (գույգ հիմքի հաշվով):

Նկ. 26-ից երևում է, որ  $r$ -ի ցածր արժեքների դեպքում, երբ կապման հիմնական եղանակը ինտերկալյացիան է, 1-3 կորերը գործնականում համընկնում են մեկը մյուսի հետ, մինչդեռ  $r > 0.05$  արժեքների դեպքում կորերը հեռացած են իրարից:

$E$ -ի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց ինտերկալյացիայի հետ մեկտեղ, ի հայտ են գալիս կապման կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակները: Ընդ որում,  $E$ -ի դեպքում ևս հայտնաբերվում է որոշակի սպեցիֆիկություն GC-հաջորդականությունների նկատմամբ, ինչպես դա ցույց էր տրվել կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացված տվյալներով: Կիսաինտերկալյացիոն եղանակի դեպքում այս լիգանդի մոլեկուլները ներդրվում են  $\Gamma$ -ի միևնույն շղթայի հարևան հիմքերի միջև եղած հարթության մեջ:

Բերված նկարից նաև երևում է, որ  $r > 0.1$  դեպքում  $\delta\Delta T$ -ն նվազում է բոլոր տիպի  $\Gamma$ -ների համար: Ամենայն հավանականությամբ,  $r$ -ի հարաբերականորեն բարձր արժեքների դեպքում ( $r > 0.2$ ) չի բացառվում  $E$ -ի մոլեկուլների կիսաինտերկալյացիայի հնարավորությունը մեկը մյուսի դիմաց՝  $\Gamma$ -ի հակադիր շղթաներում, ինչը կարող է հանգեցնել դրանց հեռացմանը և  $\Gamma$ -ի դենատուրացիայի հեշտացմանը: Դրա արդյունքում կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնությունը նվազում է:  $\Gamma$ -ի հետ լիգանդների կապման ինտերկալյացիոն մեխանիզմի (ինտերկալյացիա կամ կիսաինտերկալյացիա) կախվածությունը միջին GC-պարունակությունից կարող է պայմանավորված լինել նրանով, որ այդ հաջորդականությունների հիդրատացման աստիճանը ավելի փոքր է, քան AT-կլաստերներինը, որոնցում առաջանում են կոշտ ջրային կամրջակներ:

Սովորաբար, GC-հաջորդականություններով հարուստ տեղամասերում ջրի կապված մոլեկուլները առաջացնում են ավելի փխրուն թաղանթ, քան AT-հարուստ



Նկար 26. Տարբեր GC-պարունակությամբ (Cl. Perfr. 32%) (1), (հորթի ուրցագեղձի (2) և (M. lysod. 72%) (3) ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնության փոփոխության  $\Delta T$ -ի կախվածությունը  $r$ -ից՝ լուծույթի 0,02 M իոնական ուժի դեպքում:

հատվածներում, որտեղ ԴՆԹ-ի հակառակ շղթաների միջև առաջանում են բարձր-կարգավորված ջրային կամրջակներ [167,170]: ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում այդ ջրային “կմախքը կարում” է վերջինիս եզրերը, որի հետևանքով այն ավելի դժվար հասանելի է դառնում լիզանդի մոլեկուլների ինտերկալյացիայի համար [167,170]:

Այսպիսով, մեր կողմից ստացված տվյալները վկայում են, որ ՄԿ-ի և ԷԲ-ի ինտերկալյացիայի դեպքում սպեցիֆիկություն որոշակի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների նկատմամբ չի դրսևորվում, մինչդեռ կիսաինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցության դեպքում GC պարունակությունը կարևոր դեր է կատարում նշված լիզանդներով կապման այդ տեղամասերի հազեցման դեպքում: Մյուս կողմից, ՄԿ-ը, ինչպես և ԷԲ-ը, AT հարուստ հատվածների նկատմամբ սպեցիֆիկություն չի ցուցաբերում:



## ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆ

ԴՆԹ-ի հետ անմիջականորեն կապվող ցածրամոլեկուլային միացությունների՝ լիզանդների շարքում յուրահատուկ տեղ է գրավում ԷԲ-ը, քանի որ ԴՆԹ-ի հետ դրա փոխազդեցությանը նվիրված են բազմաթիվ աշխատանքներ, որոնք տարբեր կողմերից լուսաբանում են այդ լիզանդի կապման առանձնակատկությունները: Ստացված փորձարարական տվյալների հիման վրա կառուցվել են տեսական մոդելներ, որոնց թվում կարելի է հատկապես առանձնացնել աշխատանք [156]-ը: Ըստ այդ աշխատանքում մշակված տեսության, ԷԲ-ը բազմաբնույթ լիզանդ է և կարող է կապվել ԴՆԹ-ի հետ տարբեր եղանակներով:

Զարգացված տեսությունը հայտնաբերել է նաև միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ կոմպլեքսագոյացում այնպիսի լիզանդների համար, որոնք համարվում են ԴՆԹ-ի երկպարույր կառուցվածքի ամրակներ, դրանց թվում են ԷԲ-ը, ակտինոմիցին Դ-ն (ԱՄԴ): Տեսության այդ դրույթները հաստատվել են միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության փորձարարական ուսումնասիրությունների արդյունքում: Այդ աշխատանքի արժեքը կայանում էր նրանում, որ տեսական ապարատի միջոցով կարելի էր կանխատեսել կապման եղանակների հնարավոր թիվը և որոշել կապման թերմոդինամիկ պարամետրերի արժեքները:

Հետագայում, այդ մոդելի հիման վրա իրականացվել են երկշղթա և միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության փորձարարական ուսումնասիրություններ և բացահայտվել է, որ այս լիզանդը, ինտերկալացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակների հետ համատեղ, և՛ միաշղթա, և երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ կապվում է նաև կիսաինտերկալացիոն եղանակով: Փորձարարական հետազոտությունների արդյունքում ստացվել են նաև K-ի և n-ի՝ այդ եղանակներին համապատասխանող արժեքները, որոնք լավ համընկնում են տեսականորեն հաշվարկված տվյալների հետ [156]:

Այսպիսով, մշակված մոդելի արժեքը կայանում է նրանում, որ այն կարող է հիմք հանդիսանալ ԴՆԹ-ի հետ փոխազդող այլ լիզանդների ուսումնասիրությունների համար: Այս փաստը հիմք է հանդիսացել տվյալ ԴՆԹ-ի հետ տարբեր լիզանդների՝ ԷԲ-ի, ՄԿ-ի, Hoechst 33258-ի փոխազդեցության ուսումնասիրության և ստացված տվյալների համեմատման համար:

Առաջադրված խնդիրների փորձարարական լուծման համար հաճախ պահանջվում են զգայուն և ճշգրիտ մոտեցումներ: Այս տեսանկյունից, հիմնական փորձարարական ուսումնասիրություններից առաջ կատարվել է PYE Unicam-SP8-100 սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացում LabView միջավայրում ծրագրային ապահովմամբ, որի արդյունքում մեծացել է սպեկտրաֆոտոմետրի միջոցով կլանման և ջերմաստիճանի չափումների ճշգրտությունը:

Նկարագրված են սպեկտրաֆոտոմետրի բլոկ-սխեման և համակարգչին դրա միացման սխեման: Սպեկտրաֆոտոմետրի արդիականացման արդյունքում ընդլայնվել է փորձարարական այն խնդիրների շրջանակը, որոնք իրականացվում են սպեկտրաֆոտոմետրի կիրառմամբ՝ համապատասխան ծրագրերի մշակմամբ, ինչը թույլ է տվել սպեկտրաֆոտոմետրի ելքի անալոգային ազդանշանը վերափոխել թվայինի և հետագայում վերլուծել այդ ինֆորմացիան՝ կատարված չափումները դարձնելով ավելի ճշգրիտ:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է հորթի ուրցագեղձից անջատված ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցությունը: Ստացված տվյալներից պարզվել է, որ այս լիզանդը, ինչպես ԷԲ-ը, կարող է կապվել ԴՆԹ-ի հետ տարբեր եղանակներով: Ընդ որում, ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակները կախված են դրանց մոլային հարաբերությունից՝  $r$ -ից ( $r = [\text{լիզանդ}] / [\text{ԴՆԹ}]$ ):

$r$ -ի համեմատաբար մեծ արժեքների դեպքում ՄԿ-ի կլանման սպեկտրներում դիտվում է զգալի հիպոքրոմային էֆեկտ, սակայն այդ ընթացքում  $\lambda_{max}$ -ի շեղում չի հայտնաբերվում: Այդ պայմաններում տեղի է ունենում նաև ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարում, որը պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ ՄԿ-ի մոլեկուլները փոխազդում են ԴՆԹ-ի ֆոսֆատային խմբերի հետ էլեկտրաստատիկ եղանակով՝ առաջացնելով սյունակներ ԴՆԹ-ի պարույրի արտաքին կողմից:

$r$ -ի նվազման դեպքում, բացի ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարումից, դիտվում է նաև կլանման մաքսիմումների կարմիրալիքային շեղում, որը վկայում է այն մասին, որ նախընտրելի է դառնում կապման կիսահինտերկալացիոն եղանակը, որի դեպքում ՄԿ-ի մոլեկուլները ներդրվում են ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկի հարևան հիմքերի հարթությունների միջև:

Սկետչարդի մեթոդով փորձարարական տվյալների վերլուծության հիման վրա կառուցվել է ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման կորը: Պարզվել է, որ այդ կորը կազմված է երկու ուղղագիծ հատվածներից, ինչը վկայում է կապման երկու եղանակների գոյության մասին: Ստացվել են այդ եղանակներին համապատասխանող K-ի և n-ի արժեքները:

Ստացված տվյալների համեմատումը ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համապատասխան մեծությունների հետ թույլ է տվել հաստատելու, որ ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է հիմնականում երկու՝ ուժեղ (կիսաինտերկալացիոն) և թույլ (էլեկտրաստատիկ) եղանակներով:

ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսները ուսումնասիրվել են նաև հալման մեթոդով՝ լուծույթի 0,002 և 0,02 մոլ իոնական ուժի պայմաններում: Ստացվել են հալման ջերմաստիճանի և հալման միջակայքի լայնության արժեքները՝  $r = \text{լիզանդ/ԴՆԹ}$  կոնցենտրացիոն հարաբերության փոփոխության  $0 < r \leq 0,33$  միջակայքում: Պարզվել է, որ լիզանդի կոնցենտրացիայից կախված ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների հալման միջակայքի լայնության փոփոխությունը 0,02 M իոնական ուժում աճում է,  $r \leq 0,1$  արժեքների դեպքում և դուրս է գալիս հարթակ, երբ  $r > 0,1$ :

Լուծույթի 0,002 մոլ իոնական ուժում լիզանդի կոնցենտրացիայից կախված այդ պարամետրը ձեռք է բերում զանգակաձև տեսք: Մինևույն ժամանակ պարզվել է, որ լիզանդի կոնցենտրացիայից կախված՝ հալման ջերմաստիճանը աճում է լուծույթի նշված իոնական ուժերի դեպքում:

Այդ տվյալների համեմատումը ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համար ստացված տվյալների հետ ի հայտ է բերել, որ ՄԿ-ը լուծույթում աղի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ԴՆԹ-ի հետ կապվում է երեք՝ ինտերկալացիոն, կիսաինտերկալացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով:

Լուծույթում աղի մեծ կոնցենտրացիաների և  $r$ -ի ( $\leq 0,05$ ) փոքր արժեքների դեպքում ՄԿ-ի միացման հիմնական եղանակը դառնում է հարևան հիմքերի հարթությունների միջև լիզանդի մոլեկուլների ներդրումը՝ կիսաինտերկալացիոն փոխազդեցությունը: Լիզանդի համեմատաբար մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում հիմնական է դառնում ՄԿ-ի և ԴՆԹ-ի ֆոսֆատային խմբերի միջև էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունը:

Ցույց է տրված, որ ԷԲ-ի դեպքում որոշակի սպեցիֆիկություն է դրսևորվում ԴՆԹ-ի GC հաջորդականությունների նկատմամբ կիսաինտերկալացիոն եղանակով փոխազդեցության ժամանակ, H33258-ը՝ AT հաջորդականության նկատմամբ՝ լուծույթի բարձր իոնական ուժերում, քանի որ  $\mu \leq 0,02$  M իոնական ուժերում այդ լիզանդը սպեցիֆիկություն չի ցուցաբերում: Միևնույն ժամանակ չի բացառվում ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի ինտերկալացիոն եղանակով փոխազդեցությունը (գերազանցապես GC հարուստ հատվածների հետ) ( տես [167]):

ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների համար ստացված արդյունքների համեմատությունը ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համար ստացված տվյալների հետ բացահայտում է, որ այս լիզանդը նույնպես ցուցաբերում է սպեցիֆիկություն ԴՆԹ-ի GC հաջորդականությունների նկատմամբ:

Մյուս կողմից, ցածր իոնական ուժերում մեր կողմից ստացված տվյալները վկայում են, որ ՄԿ-ը նույնպես ԴՆԹ-ի հետ կապվում է մի քանի եղանակներով, մինչդեռ ավելի մեծ իոնական ուժերի դեպքում այս լիզանդի միացման ոչ բոլոր եղանակներն են դրսևորվում, մասնավորապես, լրիվ ինտերկալացիան դառնում է թերմոդինամիկորեն ոչ ձեռնտու:

Մյուս կողմից, ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման մեխանիզմները որակապես չեն փոխվում իոնական ուժից կախված, ինչպես H33258-ի դեպքում: Ընդ որում, մեր կողմից ստացված տվյալները լավ համապատասխանում են գրականության տվյալների հետ:

## ԵԶՐԱՀԱՆԳՈՒՄՆԵՐ

1. Հաստատված է, որ ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման եղանակները կախված են լիզանդ/ԴՆԹ մոլային հարաբերությունից՝  $r$ -ից:  $r \geq 0,25$  արժեքների դեպքում կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում դիտվում է զգալի հիպոքրոմային էֆեկտ, ինչպես նաև ֆլուորեսցենցիայի մարում 682 նմ-ի տակ:
2.  $r < 0,2$  արժեքների դեպքում, հիպոքրոմային էֆեկտին զուգահեռ դիտվում է կարմիր շեղում կլանման սպեկտրներում և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների ինտենսիվության աճ՝ 583 նմ-ի տակ:
3. Լուծույթի 0,002 մոլ/լ իոնական ուժի դեպքում ՄԿ-ը, ինչպես ԷԲ-ը, ԴՆԹ-ի հետ կապվում է առնվազն երեք՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով:
4. Լուծույթի 0,02 մոլ/լ իոնական ուժի դեպքում ինտերկալյացիա չի դրսևորվում և ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է երկու՝ կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով, մինչդեռ ԷԲ-ի դեպքում վերը նշված երեք եղանակներն էլ դրսևորվում են:
5. Լուծույթի 0,02 մոլ/լ իոնական ուժի պայմաններում որոշվել են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման հաստատունի՝  $K$ -ի և կապման մեկ տեղին համապատասխանող նուկլեոտիդների թվի՝  $n$ -ի արժեքները կապման երկու եղանակների համար: Այդ եղանակների համար ստացված երկու պարամետրերի արժեքներն էլ տարբերվում են իրարից. դրանցից մեկը համապատասխանում է սահմանափակ թվով կապման տեղամասերով ուժեղ, մյուսը՝ կապման ավելի մեծ թվով տեղամասերով թույլ եղանակին:
6. Բացահայտվել է, որ կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում, անկախ լուծույթի իոնական ուժից, ՄԿ-ը, ինչպես և ԷԲ-ը, ցուցաբերում է սպեցիֆիկություն ԴՆԹ-ի GC հարուստ հատվածների նկատմամբ, մինչդեռ AT հարուստ հատվածների նկատմամբ այդպիսի սպեցիֆիկություն չի հայտնաբերվել:

## Գրականություն

1. Вардеванян П. О., Антонян А.П. // Биологический. журнал Армении, 2010, т. 62, № 3, с.50-58.
2. Lane A.N., Jenkins T.C. // Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands// Q. Rev. Biophys., 2000, v. 33, №3, p. 255-306.
3. Nafisi Sh., Saboury A.A., Keramat N., Neault J.-F., Tajmir-Riahi H.-A. // Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue // Journal of Molecular Structure, 2007, v. 827, p.35-43.
4. Lin X., Ni Yo., Kokot S. // An electrochemical DNA-sensor developed with the use of Methylene Blue as a redox indicator for the detection of DNA damage induced by endocrine-disrupting compounds. *Analitica Chimica Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.050>.
5. Վարդևանյան Պ.Հ. //Նուկլեինաթթուների կենսաֆիզիկա // Բուհական ձեռնարկ: Հայրապետ հրատ., Երևան, 2010, է. 212:
6. Kelley S.O., Orellana G., Barton J.K. // Luminescence quenching by DNA-bound viologens: effect of reactant identity on efficiency and dynamics of electron transfer in DNA.// J. Photochem Photobiol B, 2000, v.58, p.72–79
7. Kumar C.V., Asuncion E.H. // DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe // J. Am. Chem. Soc., 1993, v.115, p.8547–8553.
8. Зенгер В. // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот//. М.: Мир, 1987, с. 584.
9. Антонян А.П. // Мультимода́рное взаимодействие лигандов с ДНК. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Ереван, 1998, с.112.
10. Hurley, L. H.&Chaires, J. B. // Advances in DNA Sequence-Specific Agents// Greenwich, CT: JAI Press Inc. 1996, v. 2.
11. Haq I. // Isothermal titration calorimetry in the study of DNA-drug interactions // In Biocalorimetry (eds. Ladbury J.E. & Chowdhry B.Z.), Chichester, UK: Wiley and Sons 1998, p. 39-61.

12. Haq I., Jenkins T.C., Chowdhry B.Z., Ren J., Chaires J.B. // Parsing the free energy of drug-DNA interactions. // *Methods Enzymol.*, 2000, v. 323, p. 373-405.
13. Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B. // Specific binding of Hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> duplex: calorimetric and spectroscopic studies. // *J. Mol. Biol.*, 1997, v. 271, p. 244-257.
14. Rentzeperis D., Marky L.A., Dwyer T.J., Geierstanger B.H., Pelton J.G., Wemmer D.E. // Interaction of minor groove ligands to an AAATT/AATTT site: correlation of thermodynamic characterization and solution structure // *Biochemistry*, 1995, v. 34, №9, p.2937-2945.
15. Berman H.M. // Hydration of DNA // take 2. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1994, v. 4, p. 345-350.
16. Berman H.M., Gelbin A., Westbrook J. // Nucleic acid crystallography: a view from the nucleic acid database. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1996, v. 66, p. 255-288.
17. Hopkins H.P., Fumero J., Wilson W.D. // Temperature-dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA – effect of alkylamine chains. // *Biopolymers*, 1990, v. 29, p. 449-459.
18. Searle M.S., Lane A.N. // <sup>31</sup>P NMR investigation of the backbone conformation and dynamics of the hexamer duplex d(GCATGC)<sub>2</sub> in its complex with the antibiotic nogalamycin. // *FEBS Lett.* 1992, v. 297, p. 292-296.
19. Taberero L., Verdaguer N., Coll M., Fita J., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Ayamamai J. Binding of an antitumor drug to DNA netropsin and CGCGAATT<sup>Br</sup>CGCG. // *Biochemistry*, 1993, v. 32, p. 8403-8410.
20. Suh D., Chaires J.B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. // *Bioorganic Med. Chem.*, 1995, v. 3, p. 723-728.
21. Chaires J.B., Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewloka T., Priebe W. // Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. // *Biochemistry* 1996, v.35, p. 2047-2053.
22. Chaires J.B. Dissecting the free energy of drug binding to DNA. // *Anticancer Drug Des.*, 1996, v.11, p. 569-580.

23. Pastre D., Pietrement O., Zozime A., Cam E. // Study of the DNA/Ethidium Bromide Interactions on Mica Surface by Atomic Force Microscope: Influence of the Surface Friction // *Le Biopolymers* 2005, v.77, p. 53-62.
24. Lane A.N. Conformation of nucleic acids: problems and solutions. // In ACS Symposium Series 682, *Molecular Modeling of Nucleic Acids* (eds. Leontis, N.B. & Santa Lucia J.), 1998, p. 106-121.
25. Bugs M.R., Cornelio M.L. // Analysis of the ethidium bromide bound to DNA by photoacoustic and FTIR spectroscopy // *Photochem, Photobiol.* 2001, v. 74, p. 512-520.
26. Jenkins T.C., Lane A.N. // AT selectivity and DNA minor groove binding by bis(amidine) ligands: molecular modeling, NMR and structural studies of the interactions of propamidine and pentamidine with d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub>. // *Biochem. Biophys. Acta*, 1997, v. 1350, p. 189-204.
27. Jenkins T.C., Neidle S., Brown D.G., Lane A.N. // NMR and molecular modeling studies of the interaction of berenil and pentamidine with d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub>. // *Eur. J. Biochem.*, 1993, v. 213, p. 1175-1184.
28. Breusegum S.Y., Loontjens F.G., Regenfuss P., Clegg R.M. // Kinetics of Binding of Hoechst Dyes to DNA Studied by Stopped-Flow Fluorescence Techniques. // *Methods Enzymol.*, 2001, v. 340, p. 212-233.
29. Doung T.H., Zakrzewska K. Influence of drug binding on DNA flexibility: A normal mode analysis. // *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1997, v. 14, №6, p. 691-701.
30. Zimmer Ch., Wahnert U. // Non-intercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material // *In Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1986, v. 47, p. 31-112.
31. Laughton, C. A., Jenkins, T. C., Fox, K.R., Neidle, S.// Interaction of berenil with the tyrT DNA sequence studied by footprinting and molecular modelling. Implications for the design of sequencespecific DNA recognition agents // *Nucleic Acids Res.* 1990, v. 18,p. 4479-4488.



32. Jenkins, T. C. DNA Template-Directed Drug Design ; Old Toys, New Methods and a Fresh Approach. London: Greenwich University Press. 1997.
33. Jenkins, T. C. Hydrophobic surface burial:lubrication for DNA-drug binding in aqueous solution. British Biophysical Society : Structure Function and Dynamics of Nucleic Acids, Guildford, Surrey, UK: 1998.
34. Jenkins, T. C. Recent HS-DSC and ITC studies of DNA and DNA-ligand interactions. 2nd International Conference on Applications of Biocalorimetry, Halle, Germany. 1999.
35. Jenkins, T. C. Targeting multi-stranded DNA structures. Current Med. Chem. 2000, v. 7, p. 99-115.
36. Abu-Daya, A., Brown, P.M. & Fox, K. R. DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands. Nucleic Acids Res. 1995, v.23, p. 3385-3392.
37. Conte M. R., Jenkins, T. C. & Lane, A. N. Interaction of minor groove-binding diamidine ligands with an asymmetric DNA duplex: NMR and molecular modelling studies. Eur. J. Biochem. 1995, v.229, p. 433-444.
38. Conte, M. R., Conn, G. L., Brown, T. & Lane, A.N. // Hydration of the RNA duplex (r(CGCAAUUUGCG)<sub>2</sub>) determined by NMR // Nucleic Acids Res. 1996, v.24, p. 3693-3699.
39. Nunn, C. M., Jenkins, T.C. & Neidle, S. Crystal structure of d(CGCGAATTCGCG) complexed with propamidine, a short-chain homologue of the drug pentamidine. Biochemistry 1993, v.32, 1383-1384.
40. Nunn, C.M. & Neidle, S. Sequence-dependent drug binding to the minor groove of DNA: crystal structure of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> complexed with propamidine. J. med. Chem. 1995, v.38, p. 2317-2325.
41. Nunn, C. M., Trent, J.O. & Neidle, S. A model for the [C-GJC]<sub>n</sub> triple helix derived from observation of the C-G[C base triplet in a crystal structure. FEBS Lett. 1997, v.416, p. 86-89.
42. Brown D.G., Sanderson M.R., Skelly J.V., Jenkins T.C., Brown T., German E., Stuart D.I., Neidle S. //Crystal structure of a berenil-dodecanucleotide complex: the role of water in sequence-specific binding. EMBO J., 1990, v. 9, p.1329-1334.
43. Edward K.J., Brown D.G., Spink N., Skelly J.V., Neidle S. // Molecular structure of the B-

- DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub>. J. Molec. Biol., 1992, v. 226, p. 1161-1173.
44. Lane A.N., Jenkins T.C., Brow T., Neidle S. // Conformation of the EcoR1 dodecamer in solution and its interaction with the minor groove binding drug berenil // Biochemistry, 1991, v. 30, p.1372-1385.
  45. Lane A.N., Jenkins T.C., Frenkiel T.A. // Hydration and solution structure of d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> and molecular modeling. Biochim. Biophys. Acta, 1997, v. 1350, p.205-220.
  46. Lane A.N., Frenkiel T.A., Bauer C.J. // Determination of conformational transition rate in the trp promoter by <sup>1</sup>H NMR rotating frame T<sup>1</sup> and cross-relaxation rate measurements. Eur. Biophys. J., 1993, v. 21, p. 425-431.
  47. Rentzeperis D., Ko J., Marky L.A. // Contribution of loops and nicks to the formation of DNA dumbbells: melting behavior and ligand binding. Biochem., 1993, v. 16, " 32 (10), p. 2564-2572.
  48. Pelton, J.G. & Wemmer, D. E. Structural modeling of the distamycin A-d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> complex using 2D-NMR and molecular mechanics. Biochemistry 1988, v. 27, p. 8088-8096.
  49. Pelton, J.G. & Wemmer, D. E. Structural characterization of a 2:1 distamycin A[d(CGCAAATTGGC)] complex by two-dimensional NMR. Proc. natn. Acad. Sci. USA 1989, v. 86, p.5723-5727.
  50. Hurley, L. H.&Chaires, J. B. Advances in DNA Sequence-Specific Agents, Greenwich, CT: JAI Press Inc. 1996, vol. 2,
  51. Chen, X., Ramakrishnan, B., Rao, S. T. & Sundaralingam, T. M. Binding of two distamycin A molecules in the minor groove of an alternating B DNA duplex. Nature Struct. Biol. 1994, v. 1, p.169-175.
  52. Chen, X., Ramakrishnan, B. & Sundaralingam, T. M. Crystal structures of B-form DNA±RNA chimers complexed with distamycin. Nature Struct. Biol.1995, v.2, p.733-775.
  53. Cantor Ch. R., Schimmel P.R. Biophysical Chemistry. W.H. Freeman and Company San Francisco,1980, Part 1
  54. Лакович Дж. / Основы флуоресцентной спектроскопии. Москва, "Мир", 1986.

55. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimmers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 2003, v. 71, p.87–98.
56. Orth K, Beck G, Genze F, Ruck A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. *J. Photochem Photobiol B* 2000, v. 57, p.186–192.
57. Zhao G.C., Zhu J.J., Chen H.Y. Spectroscopic studies of the interactive model of methylene blue with DNA by means of  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochim Acta A* 1999, v.55, p.1109–1117.
58. Zhao G.C., Zhu J.J., Zhang J.J., Chen H.Y. Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of  $\beta$ -cyclodextrin. *Anal Chim Acta* 1999, v.394, p.337–344
59. Tuite E, Norden B. Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA: a spectroscopic study. *J Am Chem Soc* 1994, v.116, p.7548–7556.
60. Ohuigin C., Mcconnell D.J., Kelley J.M., Van der Putten WJM Methylene blue photosensitised strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucl Acids Res* 1987, v.15, p.7411–7427
61. Hu Z., Tong C.L. Synchronous fluorescence determination of DNA based on the interaction between methylene blue and DNA. *Anal Chim Acta* 2007, v.587, p.187–193.
62. Zhu L., Zhao R, Wang K., Xiang H., Shang Zh., Sun. W. Electrochemical behaviors of Methylene Blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence. *Sensors*, 2008, v.8, p. 5649-5660.
63. Changlun T., Zhou H., Jianmin W. // Interaction Between Methylene Blue and Calf Thymus Deoxyribonucleic Acid by Spectroscopic Technologies. *Journal of Fluorescence*, 2010, v. 20, p. 261-267.
64. E. M. Tuite, J. M. Kelly // Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1993, v. 21, p.103-124.

65. Hossain M., Giri P., Kumar G.S. // DNA Intercalation by Quinacrine and Methylene blue: A Comparative Binding and Thermodynamic Characterization Study. *DNA and Cell Biology*, 2008, v. 27, " 2, p. 81-90
66. Rohs R., Sklenar H. Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: Minor groove binding is favored over intercalation. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 2004, v. 21, " 5, p. 699-711.
67. R. Rohs, H. Sklenar, R. Lavery, B. Roder. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. *Journal of The American Chemical Society*, 2000, v.122, p. 2860-2866.
68. Fujimoto B.S., Clendenning J.B., Delrow J.J., Heath P.J., Schurr M. Fluorescence and photobleaching studies of methyleneblue binding to DNA. *J Phys Chem* v.98, p. 6633–6643
69. Вардеванян П.О. Структурные переходы в ДНК и ДНК-белковых комплексах при различных функциональных состояниях генома. // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Ереван, 1990, с.246.
70. C.G. Sibley and J.E. Ahlquist "The Phylogeny of the Hominoid Primates, as Indicated by DNA-DNA Hybridization". *Journal of Molecular Evolution* 1984, v.20 (1), p. 2–15.
71. Ren J., Jenkins T.C., Chaires J.B. // Energetics of DNA interaction reactions. *Biochemistry*, 2000, v. 39, p. 8439-8447.
72. Mcateer K., Ellis P.D., Kennedy M.A. // The effects of sequence context on base dynamics at TpA steps in DNA studied by NMR. *Nucleic Acids Res.*, 1995, v. 23, p. 8022-8035.
73. Rinkel L.J., van der Marel G.A., van Boom J.H., Altona C. // Influence of N6-methylation of residue A(5) on the conformational behaviour of d(C-C-G-A-A-T-T-C-G-G) in solution studied by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. of Biochem.*, 1987, v.163, p. 275-286.
74. Fawthrop S.A., Yang J.C., Fisher J. // Structural and dynamic studies of a non-self-complementary dodecamer DNA duplex. *Nucleic Acids Res.*, 1993, v. 21, p. 4860-4866.
75. Finkelstein A.V., Janin J. // The price of lost freedom: entropy of biomolecular complex formation. *Prot. Eng.*, 1989, v.7, p. 1-3.
76. Holbrook J.A., Capp M.W., Saecker R.M., Record M.T. // Enthalpy and heat capacity

- changes of an oligomeric DNA duplex: interpretation of coupled processes of formation and association of single-stranded helices. *Biochemistry*, 1999, v. 38, p. 8409-8422.
77. Jelesarov I., Bosshard H.R. // Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Molec. Recognit.*, 1999, v. 12, p. 3-18.
  78. Jelesarov I., Crane-Robinson C., Privalov P.L. // The energetics of HMG box interactions with DNA: thermodynamic description of the target DNA duplexes. *J. molec. Biol.*, 1999, v. 294, p. 981-995.
  79. Calladine C.R., Drew H.R. // *Understanding DNA*. San Diego: Academic Press. 2004.
  80. Alhambra C., Luque F.J., Gago F., Orozco M. // Ab initio study of stacking in A- and B-DNA. *J. Phys. Chem.*, 1997, v. 101, p. 3846-3853.
  81. Norberg J., Nilsson L. // Solvent influence on base stacking. *Biophys. J.*, 1999, v. 74, p. 394-402.
  82. Gueron M., Leroy J.L. // Studies of base-pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. *Meth. Enzymol.*, 1995, v. 261, p. 383-412.
  83. Asensio J.L., Dhesai J., Bergqvist S., Brown T., Lane A.N. // The contribution of cytosine protonation to triplex stability. *J. Mol. Biol.*, 1998, v. 275, p. 811-822.
  84. Asensio J.L., Dosanjh H., Jenkins T.C., Lane A.N. // Thermodynamic, kinetic and conformational properties of parallel intermolecular DNA triplex containing 5' and 3' junctions. *Biochemistry*, 1998, v. 37, p. 15188-15198.
  85. Kamiya M., Torigoe H., Shindo H., Sarai A. // Temperature dependence and sequence specificity of DNA triplex formation: an analysis using isothermal titration calorimetry. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, v. 118, p. 4532-4538.
  86. Hunter C.A. // Sequence-dependent DNA structure: the role of base-stacking interactions. *J. Mol. Biol.*, 1993, v. 230, p. 1025-1054.
  87. Hunter C.A., Lu X.J. // DNA base-stacking interactions: a comparison of theoretical calculations with oligonucleotide X-ray crystal structures. *J. Mol. Biol.*, 1997, v. 265, p. 603-619.
  88. Packer M.J., Hunter C.A. // Sequence-dependent DNA structure: the role of the sugar-phosphate backbone. *J. Mol. Biol.*, 1998, v. 280, p. 407-420.

89. Kazazian H.H Jr. Mobile DNA. Finding Treasure in Junk, 2014, p.268
90. Tu K., Gochin M. // Structure determination by restrained molecular dynamics using NMR pseudo contact shifts as experimentally determined constraint, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, v. 121, p. 9276-9285.
91. Wada A., Tachibana H., Gotoh O., et al. // Long range homogeneity of physical stability in double stranded DNA. *Nature*, 1976, " 263, p. 439-441.
92. Quintana J.R., Grzeskowiak K., Yanagi K., Dickerson R.E. // Structure of a B-DNA decamer with a central TA step: CGATTAASTCG. *J. Mol. Biol.*, 1992, v. 225, p. 379-395.
93. Subirana J.A., Faria T. // Influence of sequence on the conformation of the B-DNA helix. *Biophys. J.*, 1997, v. 73, p. 333-338.
94. Yanagi K., Prive G. G., Dickerson R. E. // Analysis of Local Helix Geometry in Three B-DNA Decamers and Eight Dodecamers. *J. Mol. Biol.*, 1991, v.217, p. 201-214.
95. Digabriele A.D., Sanderson M.R., Steitz T.A. // Crystal-lattice packing is important in determining the bend of a DNA dodecamer containing an adenine tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, v. 86, p. 1816-1820.
96. Nelson H.C.M., Finch J.T., Luisi B.F., Klug A. // The structure of an oligo(dA)-oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature*, 1987, v. 330, p. 221-226.
97. R.M. Myers, T. Maniatis, and L.S. Lerman "Detection and Localization of Single Base Changes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". *Methods in Enzymology*. *Methods in Enzymology* 1987, v.155, p. 501-527.
98. Breslauer K.J. // Extracting thermodynamic data from equilibrium melting curves for oligonucleotide order-disorder transitions. In *Methods Molec. Biol., Protocols for oligonucleotide conjugates* (ed. Agrawal S.), Totawa, NJ: Humana Press Inc., 1994, v. 26. chapter 14, p. 347-372.
99. Chalikian T.V., Plum G.E., Sarvazyan A.P., Breslauer K.J. // Influence of drug binding on DNA hydration: acoustic and densimetric characterizations of netropsin binding to the poly(dA-dT)-poly(dA-dT) and poly(dA)-poly(dT) duplexes and the poly(dT)-poly(dA)-poly(dT) triplex at 25 °C. *Biochemistry*, 1994, v. 26, " 33(29), p. 8629-8640.
100. Chalikian T.V., Volker J., Plum G.E., Breslauer K.J. // A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and

- volumetric techniques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, v. 96, p. 7853-7858.
101. Ebel S., Brown T., Lane A.N. // Thermodynamic stability and solution conformation of tandem G-A mismatches in RNA and RNA-DNA hybrid duplexes. Eur. J. Biochem., 1994, v. 220, p. 703-715.
  102. Ebel S., Lane A.N., Brown T. // Very stable mismatch duplexes. Structural and thermodynamic studies on tandem G-A mismatches in DNA. Biochemistry, 1992, v. 31, p. 12083-12086.
  103. Egli M., Portmann S., Usman N. // RNA hydration: a detailed look. Biochemistry, 1996, v. 35, p. 8484-8489.
  104. Eimer W., Williamson J.R., Boxer S.G., Pecora R. // Characterization of the overall and internal dynamics of short oligonucleotides by depolarized dynamic light scattering and NMR relaxation experiments. Biochemistry, 1990, v. 29, p. 799-811.
  105. Fawthrop S.A., Yang J.C., Fisher J. // Structural and dynamic studies of a non-self-complementary dodecamer DNA duplex. Nucleic Acids Res., 1993, v. 21, p. 4860-4866.
  106. Finkelstein A.V., Janin J. // The price of lost freedom: entropy of biomolecular complex formation. Prot. Eng., 1989, v.7, p. 1-3.
  107. Gueron M., Leroy J.L. // Studies of base-pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. Meth. Enzymol., 1995, v. 261, p. 383-412.
  108. Jayaram B., Sprous D., Young M.A., Beveridge D.L. // Free energy analysis of the conformational preferences of A and B forms of DNA in solution. J. Am. chem. Soc., 1998, v. 120, p. 10629-10633.
  109. Jenkins T.C., Haq I., Halla M., Chowdhry B.Z. // DNA tetraplexes: a re-evaluation using calorimetric techniques. 54<sup>th</sup> Annual Calorimetry Conference (CALCON99), Tallahassee, Florida, USA, 1999, p. 15-20.
  110. Jurandir R. de Souza, Clarissa S. P. de Castro and Carlos Bloch Jr., J. Braz // Zinc binding to lambda phage DNA studied by voltammetric techniques. J. Braz. Chem. Soc., 2000, v. 11, " 4, p. 398-404.
  111. Lee S.A., Sclavi B., Powell J.W., Rupprecht A. // Binding of an antitumor drug to DNA netropsin and CGCGAATT<sup>Br</sup>CGCG. Phys. Rev. E48, 1993, p. 2240-2245.
  112. Plum G.E., Breslauer K.J. // Thermodynamics of an intermolecular DNA triple helix: a

- calorimetric and spectroscopic study of the pH and salt dependence of thermally induced structural transitions. *J. Mol. Biol.*, 1995, v. 248, p. 679-695.
113. Rouzina I., Bloomfield V.A. // Heat capacity effects on the melting of DNA. 1. General aspects. *Biophys. J.*, 1999, v. 77, p. 3242-3251.
  114. Juan A. Bueren-Calabuig, Christophe Giraudon, Carlos M. Galmarini, Jean Marc Egly<sup>2</sup> and Federico Gago<sup>1\*</sup> // Temperature-induced melting of double-stranded DNA in the absence and presence of covalently bonded antitumour drugs: insight from molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Research*, 2011, v. 39, " 18, p. 8248-8257.
  115. Mcrgny,J.L. and Lacroix,L. // Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, 2003, v.13, p.515-537.
  116. Borer P.N., Laplante S.R., Kumar A., Zanatta N., Martin A., Levy G.C. // <sup>13</sup>C-NMR relaxation in three DNA oligonucleotide duplexes – model-free analysis of internal and overall motion. *Biochemistry*, 1994, v. 33, p. 2441-2450.
  117. Stucki M., Stagljjar I., Jonsson Z.O. and Hubschr. U. // A coordinated interplay: proteins with multiple functions in DNA replication, DNA repair, cell cycle/checkpoint control, and transcription. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mot. Biol.*, 2001, v.65, p. 261-298.
  118. Negri A., Marco E., Garcia-Hernandez V., Domingo A., Llamas-Saiz A.L., Porto-Sanda S., Riguera R., Laine W., David-Cordonnier M.H., Bailly C. et al.// Antitumor activity. X-ray crystal structure, and DNA binding properties of thioeoraline A, a natural bis-intercalating thiopeptide. *J. Med. Chem.*, 2007, v.50, p.3322-3333.
  119. Lawley P.D. and Phillips D.H. // DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat. Res.*, 1996, v.355, p.13-40.
  120. Manzanares I., Cucvas C. Garcia-Nieto R., Marco E. and Gago F. // Advances in the chemistry and pharmacology of ecteinascidins, a promising new class of anticancer agents. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 2001, v.1, p.257-276.
  121. Lca J. F., Martinez-Dicz M., Garcia-Hernandez V., Monco V., Domingo A., Bueren-Calabuig J.A., Negri A., Gago.F., Guillen-Navarro M.J., Avilcs P. et al. // PM01183, a new DNA minor groove covalenti binder with potent in vitro and in vivo anti-tumour activity. *Brit. J. Pharmacol.*, 2010,v. 161, p.1099-1110.



122. Drukkcr K. and Schatz G.C. // A model for simulating dynamics of DNA denaturation. *J. Phys. Chem. B.* 2000, v.104, p. 6108-6111.
123. Drukkcr K., Wu G. and Schatz G.C. // Model simulations of DNA denaturation dynamics. *J. Chem. Phys.*, 2001, v.14, p.579-590.
124. Linak M.C. and Dorfman K.D. //Analysis of a DNA simulation model through hairpin melting experiments. *J. Chem. Phys.*,2010, v.133, "125 p.101.
125. Kannan S. and Zacharias M. //Simulation of DNA double-strand dissociation and formation during replica-exchange molecular dynamics simulations. *Phvs. Chem. Chem. Phvs.*, 2009, v.11, p.10589-10595.
126. Hagan M.F., Dinnrcr A.R., Chandier D. and Chakraborty A.K. // Atomistic understanding of kinetic pathways for single base-pair binding and unbinding in DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, v.100, p.13922-13927.
127. Wong K.Y. and Pcttitt B.M. // The pathway of oligomeric DNA melting investigated by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 2008, v.95, p. 5618-5626.
128. Aqvist J. // Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.*, 1990, v.94, p. 8021-8024.
129. Frickman R.A. and Honig B. // A free energy analysis of nucleic acid base stacking in aqueous solution. *Biophys. J.*, 1995, v.69, p.528-1535.
- 130.T. Po, G. Steger, V. Rosenbaum, J. Kaper, and D. Riesner "Double-stranded cucumovirus associated RNA 5: experimental analysis of necrogenic and non-necrogenic variants by temperature-gradient gel electrophoresis". *Nucleic Acids Research* 1987, v.15 (13), p.5069–5083.
- 131.Breslauer, K.J. et al.; Frank, R; Blöcker, H; Marky, LA "Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986, v. 83 (11), p. 3746–3750.
- 132.Rychlik, W.; Spencer, W. J.; Rhoads, R. E. "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro". *Nucleic Acids Res.* 1990, v.18 (21), p. 6409–6412.
- 133.Owczarzy R., Vallone P.M., Gallo F.J., Paner T.M., Lane M.J. and Benight A.S "Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers". *Biopolymers* 1997, v.44 (3), p.217–239.

134. John SantaLucia Jr. "A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 1998, v.4, p. 1460–1465.
135. John SantaLucia Jr., Donald Hicks "The thermodynamics of DNA structural motifs". Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure June 2004, v.33, p. 415–440.
136. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. // Теория одномерной адсорбции. Адсорбция малых молекул на гомополимере. Мол. биол., 1971, т. 5, "2, с. 245-251.
137. McGee J.D., von Hippel P.H. // Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. J. Mol. Biol., 1974, v. 86, p. 469-489.
138. Nechipurenko Yu.D., Mikheikin A.L. Streltsov S.A., Zasedatelev A.S., Nabiev I.R. // Mixed mode of ligand-DNA binding results in S-shaped binding curves. J. Biomol. Struct. Dyn., 2001, v. 18, "5, p.1-7.
139. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. // Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. Exp. and Mol. Medicine, 2001, v. 33, "4, p. 205-208.
140. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. // Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions. J. Biomol. Struct. Dyn., 2000, v. 18, " 2, p. 231-235.
141. Фрайфельдер Д. // "Физическая биохимия". 1980, М.:Мир., с. 584.
142. Элбакян В.Л., Саакян Н.С., Шагинян М.А., Антонян А.П., Амбарцумян Л.А., Вардеванян П.О. / Модернизация спектрофотометра и программное обеспечение для кинетических и спектрофотометрических исследований, разработанное в среде LabVIEW. Вестник инженерной академии армении (виаа), 2012, информатика, электроника, биофизика, стр. 848-853.
143. Тревис Дж., LabVIEW для всех, изд: ДМК пресс, 2005, с. 544.
144. Суранов А.Я. LabVIEW 8.20 Справочник по функциям, Изд. ДМК Пресс, 2007, с. 536.
145. Vardevanyan P.O., Karapetyan A.T., Frank-Kamenetskii M.D. Enthalpy of Helix-Coil

- Transition of DNA: Dependence on Na concentration and GC-Content. *J.of Biomol. Struct. & Dyn.*, 1990, v.8, " 1, p.131-138.
146. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. Complex-Formation of Ethidium Bromide with Poly[d(A-T)]Poly[(A-T)]. *J.of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2005, v.22, " 4, p. 465-470.
  147. B. Jayaram, D. L. Beveridge // Modeling DNA in aqueous solutions: theoretical and computer simulation studies on the ion atmosphere of DNA. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* /1996, v. 25, p. 367-394.
  148. F. Han, N. Taulier, T. Chalikian T.V. //Association of the minor groove binding drug Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>: volumetric, calorimetric, and spectroscopic characterizations // *Biochemistry*, 2005, v.44, p. 9785-9794.
  149. Ismail M. A., Rodger P. M., Rodger A.// Drug self-assembly on DNA: sequence effects with trans-bis-(4-*N*-methylpyridiniumyl) diphenyl porphyrin and Hoechst 33258// *J Biomol Struct Dyn*, 2000, v.11, p. 335-348.
  150. Chaires J. B.// *Energetics of Drug-DNA Interactions*. *Biopolymers*, 1998, v. 44, p.201-215.
  151. Lane N. In *ACS Symposium Series 682, Molecular Modeling of Nucleic Acids* (eds. Leontis, N.B. & SantaLucia J.), 1998, p.106-121.
  152. Vardevanyan P. O., Antonyan A. P, Parsadanyan M. A., Davtyan H. G., Karapetyan A. T. //The Binding of Ethidium Bromide with DNA: Interaction with Single- and Double-Stranded Structures//*Experimental and Molecular Medicine*, 2003, v. 35, № 6, p.527-533.
  153. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. // Комплексообразование бромистого этидия с одноцепочечным некоплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApApGpC). *Мол. биол.*, 1997, т. 31, "2, с. 263-273.
  154. Эдсолл Дж., Гатфренд Х. // *Биотермодинамика*. Под редакцией доктора химических наук, проф. Ю.А. Чизмадзева, 1986, М.:Мир. с.296.
  155. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Antonian A.P., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Theoretical and experimental study of conformational transitions of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on

- different forms of DNA. Structure, Motion, Interaction and Expression of Biological Macromolecules, Proceedings of the tenth conversation, NY, Albany, 1998, p. 259-266.
156. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. // Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. *J.Biomol. Struct. Dyn.*, 1996, v. 14, " 2, p. 275-283.
157. Karapetian A.T., Terzikian G.A., Megrabyan N.M., Arutyunyan S.G., Vardevanian P.O. // Theory of cooperative transitions in DNA complexes with multimodal ligands. *Mol. Biol.*, 1995, v. 29, " 4(2), p. 487-490.
158. Karapetian A.T., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: The effect of two types of interaction of ligand on the parameters of transition. *J.Biomol. Struct. Dyn.*, 1990, v. 8, " 1, p. 123-130.
159. Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Enthalpy of helix-coil transition of DNA: Dependence on Na<sup>+</sup> concentration and GC-content. *J.Biomol. Struct. Dyn.*, 1990, v. 8, " 1, p. 131-138.
160. Karapetian A.T., Minyat E.E., Vardevanian P.O., Ivanov V.I. // Thermodynamics of B-Z transition of poly[d(G-C)] in water-ethanol solution. The "Tye calorimetry". *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1989, v. 6, " 6, p. 1233-1238.
161. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Амбарцумян Л.А. / Механизмы связывания метиленового синего с ДНК. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2013, т.80, " 4, с. 610-614.
162. Leudtke N.W., Liu Q., Tor Y. // On the Electronic Structure of Ethidium//*Chem. Eur. J.*, 2004, v. 11, p. 498-508.
163. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. // Связывание бромистого этидия с нативными денатурированным poly(dA)-poly(dT). *Мол. биол.*, 2000, т. 34, "2, с. 310-315.
164. Wadkins R. M., Jares-Erijman E. A., Klement R., Rudiger A., Jovin T. M. Actinomycin D binding to sigle-stranded DNA: Sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy // *J. Mol. Biol.*, 1996, v.262, p. 53-68.

165. Hambardzumyan L.A. / Thermodynamic investigation of methylene blue complexes with DNA. Proceedings of the Yerevan state University, 2013, "1, p. 23-27.
166. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. // Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA J. Biomol. Struct. Dyn. 2008, v. 25, "6, p. 641-646.
167. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Torosyan M.A., Karapetian A.T. // The Influence of GC/AT Composition on Intercalating and Semi-Intercalating Binding of Ethidium Bromide to DNA. J. Braz. Chem. Soc., 2012, v. 23, " 11, p. 2016-2020.
168. Monaco R.R. // A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation. J. Biomol. Struct. Dyn, 2007, v. 25, " 2, p. 119-125.
169. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суrowая А.Н. // Гетерогенность мест сильного связывания этидия на ДНК. Флуоресцирующие и нефлуоресцирующие комплексы. Мол. биол, 1998, т. 32, с. 855-862.
170. Тищенко Е. И., Карапетян А.Т., Борисова О.Ф. // Гетерогенные комплексы бромистого этидия их и роль в стабилизации (dA)<sub>n</sub>-(dT)<sub>n</sub> структур. 1996, т. 30, " 6, с. 1970-1377.
171. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Shahinyan M.A., Karapetian A.T. // Thermodynamic analysis of DNA complexes with methylene blue, ethidium bromide and Hoechst 33258. Biopolymers and cell, 2013, v. 29, " 6, p. 515-520.
172. Long E.C, Barton J.K. On demonstrating DNA intercalation // Acc. Chem. Res.1990, v.23, p.271-273.
173. Eftink M.R., Ghiron C.A. Fluorescence quenching studies with proteins // Anal. Biochem 1981, v.144, p.199-227.
174. Xiang G.H., Tong C.L., Lin H.Z. Nitroaniline isomers interaction with bovine serum albumin and toxicological implications // J. Fluoresc. 2007, v.17, p.512-521
175. Li W.Y., Xu J.G., He X.W. Characterization of the binding of methylene blue to DNA by spectroscopic methods. Anal Lett 2000, v.33, p. 2453-2464

176. Chaires J.B., Dattagupta N., Crothers D.M. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on the interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1982, v. 21, p. 3933–3940.
177. Irving M.K., Donald L.H. Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. *Biochemistry* 1971, v.10, p. 3065–3069.
178. Thomas A., Atreyi M., Rao M.Vr. Interaction of methylene blue with transfer RNA a spectroscopic study. *Chem-Biol Interact* 1995, v. 97, p.199–214.
179. Kumar C.V., Turner R.S., Asuncion E.H. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect. *J. Photochem Photobiol A Chem* 1993, v.74, p.231–238.
180. Kumar C.V., Asuncion E.H. Sequence dependent energy transfer from DNA to a simple aromatic chromophore. *J. Chem Soc Chem Commun* 1992, v. 6, p. 470–472.
181. Zhang L.Z., Tang G.Q. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *J. Photoch Photobio B* 2004 v. 74, p.119–125.
182. Tong C.L., Hu Z., Liu W.P. Sensitive determination of DNA based on the interaction between Nor floxacin-Tb<sup>3</sup> complex and DNA. *J. Agric Food Chem* 2005, v. 53, p. 6207–6212.
183. Dourlent M., Helene C. A quantitative analysis of proflavine binding to polyadenylic acid, polyuridilic acid and transfer RNA. *Eur J. Biochem* 1971, v. 23, p. 86–95.
184. Armstrong R.W., Kurucsev T., Strauss U.P. The interaction between acridine dyes and deoxyribonucleic acid. *J. Am Chem Soc* 1970, v. 92, p.3174–3181.
185. Asadi M., Safaei E., Ranjbarb B., Hasanib L. Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of cationic Zn(II) and Co(II) tetrapyridino-porphyrazines to calf thymus DNA: the role of the central metal in binding parameters. *New J. Chem* 2004, v. 28, p.1227–1234.
186. Karlsson H.J., Eriksson M., Perzon E., Åkerman B., Lincoln P., Westman G. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNAbinding. *Nucl Acids Res* 2003, v. 31, p. 6227–6234.
187. Cesarone C.F., Bolognesi C., Santi L. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* 1979, v.100, p.188–197.

188. Zhen Q.X., Ye B.H., Liu J.G., Ji L.N., Wang L. Synthesis of ruthenium polypyridyl complexes and the steric influence of the intercalated ligand on DNA-binding. *Chem J. Chinese Univ*, 1999, v. 20, p.1661–1666.
189. Bergmann K., O’Konski C.T. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer and complexes with montmorillonitrile. *J. Phys Chem* 1963, v.67, p. 2169–2177.
190. Atherton S.J., Harriman A. Photochemistry of intercalated methylene blue: photoinduced hydrogen atom abstraction from guanine and adenine. *J Am Chem Soc* 1993, v.115, p.1816–1822.
191. Beddard G.S., Kelly J.M., Vander Putten WJM Picosecond study of the luminescence and transient absorption of methylene blue-polynucleotide complexes. *J. Chem Soc Chem Commun* 1990, v. 19, p.1346–1347.
192. Lin X.Y., Ni Y.N., Kokot S. Glassy glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants, *Anal. Chim. Acta* 2013, 765, p.54-62.