

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ ԱՆԻ ԱՐԹՈՒՐԻ

ԴԼԹ-ի A-ՁԵՎԻ ՀԵՏ ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ  
ՓՈԽԱԶՂԵՑՈՒԹՅԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.02 - Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ  
ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2016

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АВETИՏԻԱՆ ԱՆԻ ԱՐՏՐՈՎՆԱ

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОРФИРИНОВ  
С А-ФОРМОЙ ДНК

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
физико-математических наук по специальности  
03.00.02 - Биофизика

ЕРЕВАН-2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում  
Գիտական ղեկավար՝ ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Ե.Բ. Դալյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Ա.Թ. Կարապետյան,  
կենս. գիտ. թեկնածու  
դոցենտ Ա.Պ. Անտոնյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային  
Գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. մայիսի 20-ին, ժամը 14<sup>00</sup> -ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2016թ. ապրիլի 19-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ Մ.Ա. Փարսադանյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: доктор физ.-мат. наук,  
профессор Е.Б.Далян

Официальные оппоненты: доктор физ.-мат. наук,  
профессор А. Т. Карапетян,  
кандидат биол. наук  
доцент А.П. Антонян

Ведущая организация: Международный научно-  
образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 20-го мая 2016г., в 14<sup>00</sup> часов, на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 19-го апреля 2016г .

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** В последние годы наблюдается большой интерес к исследованию комплексов порфиринов-ДНК. Порфирины и особенно их металлопроизводные, широко распространены в природе. Они обладают сильно выраженными противогрибковыми, противовирусными, и антибактериальными свойствами. Благодаря своей способности накапливаться в опухолевых клетках, многие порфирины применяются в онкологической практике в качестве диагностического теста обнаружения формы опухоли (Dougherty T.J. et al. 1998, Sun R.W. et al. 2010).

Изучению взаимодействия порфиринов с ДНК посвящено очень много работ. Установлено, что они могут связываться с ДНК несколькими механизмами: интеркаляция и два типов внешнего связывания (Fiel R.J., et al., 1979, Pasternack R.F. et al., 1996). Однако все результаты и выводы, касающиеся механизмов взаимодействия порфиринов с ДНК, были получены для уотсон-криковской В-формы ДНК. Но в зависимости от условий среды ДНК может находиться в других конформациях, например, в условиях низкой относительной влажности она принимает А-форму. Этой форме долго не придавали значения, поскольку она возникала не при физиологических условиях. Однако когда было установлено, что в клетке двуспиральные РНК и ДНК-РНК гибриды (образующиеся при транскрипции и репликации) всегда находятся в А-форме, а в процессе деления клетки двойная спираль ДНК тоже переходит в А-форму, А-конформация двойной спирали ДНК получила биологическую значимость. Поскольку опухолевые клетки, которые в первую очередь атакуются противоопухолевыми препаратами, почти непрерывно находятся в стадии деления, то и ДНК в таких клетках достаточно часто находится в А-форме. С этой точки зрения задача исследования особенностей взаимодействия потенциально противоопухолевых порфиринов с А-формой ДНК весьма актуальна. В литературе есть несколько работ, посвященных исследованию взаимодействия порфиринов с синтетическими РНК-овыми полинуклеотидами, в которых на основании термодинамического анализа экспериментальных данных делаются выводы о механизмах связывания порфиринов с определенными нуклеотидными последовательностями (Bennett et al., 2000, A. Ghazaryan et al., 2006). Что касается проблемы исследования взаимодействия порфиринов с А-формой высокомолекулярной ДНК, то до сих пор она не рассматривалась.

В данной работе впервые исследовалось взаимодействие с А-формой ДНК водорастворимых мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (ТОЕРуР<sub>4</sub>) и его Cu(II)- и Co(II)-содержащих производных (CuТОЕРуР<sub>4</sub> и CoТОЕРуР<sub>4</sub>), проводилось сравнение с их взаимодействием с В-формой ДНК. Были исследованы термодинамика и механизмы связывания этих порфиринов с ДНК при различных ионных силах и концентрациях двухвалентных ионов Mn<sup>2+</sup>.

**Целью работы** являлось определение механизмов связывания ТОЕРуР<sub>4</sub>, CuТОЕРуР<sub>4</sub> и CoТОЕРуР<sub>4</sub> порфиринов с А-ДНК, выявление зависимости способа связывания порфирина от конформации ДНК (А- или В-

формы), проведение полного термодинамического анализа (определение  $\Delta G_b$ ,  $\Delta H_b$  и  $\Delta S_b$ ) связывания порфиринов с А- и В-формами ДНК на основании спектральных исследований, установление корреляции между механизмом связывания и изменениями термодинамических потенциалов, а также исследование влияния ионной силы и присутствия ионов  $Mn^{2+}$  на структуру порфирин - ДНК комплексов.

Для выполнения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Установление способов связывания исследованных порфиринов с А-ДНК.
2. Вычисление изменения свободной энергии Гиббса ( $\Delta G_b$ ), энтальпии ( $\Delta H_b$ ) и энтропии ( $\Delta S_b$ ) при связывании порфиринов с А-ДНК и В-ДНК.
3. Выявление корреляции между термодинамическими параметрами и способами связывания порфиринов с А- или В-формами ДНК.
4. Изучение влияния ионной силы на характер связывания порфиринов с ДНК.
5. Изучение особенностей взаимодействия порфирин/ДНК комплексов в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ .

#### **Научная новизна.**

1. Впервые был проведен полный термодинамический анализ связывания  $TOEPyP4$ ,  $CuTOEPyP4$  и  $CoTOEPyP4$  с А-формой ДНК.
2. Выявлена корреляция между соответствующими термодинамическими параметрами и способом связывания порфиринов с А-ДНК и В-ДНК.
3. Проведен сравнительный анализ механизмов взаимодействия порфиринов с различными конформациями ДНК.
4. Установлена зависимость от ионной силы механизмов связывания порфиринов с В-ДНК.
5. Установлены особенности взаимодействия ( $Cu(II)$ - и  $Co(II)$ -) порфиринов с ДНК в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ . Определены энтальпия и энтропия перехода спираль-клубок для порфирин/ДНК комплексов при полном экранировании заряда ДНК ионами  $Mn^{2+}$ .

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. На основании спектральных исследований впервые проведен полный термодинамический анализ связывания  $TOEPyP4$ ,  $CuTOEPyP4$  и  $CoTOEPyP4$  с А-формой ДНК.
2. Существует корреляция между изменением термодинамических потенциалов и способом связывания порфиринов: отрицательное значение энтальпии связывания ( $\Delta H$ ) характеризуют

- интеркаляционный способ связывания, а положительные  $\Delta H$  и большие значения  $\Delta S$  характеризуют внешнее связывание.
3. Увеличение ионной силы приводит к уменьшению константы связывания с ДНК всех порфиринов.
  4. Увеличение концентрации  $[Na^+]$  приводит к ослаблению интеркаляционного способа связывания и усилению внешнего связывания плоских ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4 порфиринов с В-ДНК, а связывание имеющего аксиальный лиганд Со-порфирина (внешнее связывание) с В-ДНК слабо зависит от ионной силы.
  5. В присутствии ионов  $Mn^{2+}$  взаимодействие низких концентраций СоТВутРуР4 с ДНК происходит методом полуинтеркаляции, а при более высоких концентрациях происходит внешнее связывание.
  6. В присутствии ионов  $Mn^{2+}$  взаимодействие низких концентраций CuТВутРуР4 с ДНК происходит методом интеркаляции, а при более высоких концентрациях происходит и внешнее связывание.

**Научная и практическая ценность работы:**

Научная ценность работы заключается, прежде всего, в установлении механизмов связывания биологически активных порфиринов с А-ДНК и В-ДНК. Исследование термодинамики взаимодействия порфиринов с ДНК при различных ионных условиях позволит дать физическое объяснение процессам, протекающим в биологических системах при участии порфиринов, а значит – целенаправленно воздействовать на них.

Полученные результаты могут быть использованы в лекционных спецкурсах по ДНК-лиганд взаимодействиям для студентов магистратуры физического и биологического факультетов ЕГУ.

Практическая ценность работы заключается в том, что результаты полученные в этой работе могут служить основой для целенаправленного синтеза лекарственных препаратов на основе порфиринов.

**Апробация работы:** Материалы диссертации обсуждались на семинарах кафедры молекулярной физики ЕГУ и докладывались на следующих научных конференциях:

- International Conference, The 16<sup>th</sup> Conversation of JBSD, Albany, USA, June 16-20, 2009.
- International Conference “Biotechnology and health”-3 & DAAD Alumni seminar, Yerevan, Armenia, October 15-17, 2009.
- International Symposium on "Solvation and Ionic Effects in Biomolecules: Theory to Experiment", May 17-21, 2010.
- International Conference, The 19<sup>th</sup> Conversation of JBSD, Albany, USA, June 9-13, 2015.
- International Symposium and Young Scientist School on Disordered and Ordered Materials Analysis and Characterization. Yerevan, Armenia, September 24-30, 2015.

**Публикации** ; По теме диссертационной работы опубликовано 8 работ.  
**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы из 112 наименований. Общий объем работы 111 страниц, включая 32 рисунка и 10 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована цель диссертационной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** диссертационной работы посвящена обсуждению структуры и конформационным изменениям ДНК в различных условиях, более подробно рассматривается А-конформация и способы ее получения. В главе рассматриваются литературные данные о структуре порфиринов. Подробно изложен обзор исследований, относящихся к конформационным изменениям ДНК и к связыванию различных металлсодержащих порфиринов с ДНК. Приведены основные факторы, влияющие на механизм взаимодействия порфиринов с ДНК.

**Вторая глава** диссертационной работы посвящена материалам и методам исследования. Описаны структура и оптические свойства порфиринов, а также подробно изложен способ получения А-формы ДНК добавлением 72% этанола к раствору В-ДНК при низких ионных условиях  $[Na^+] = 10^{-3}M$  (Ivanov, Malenkov et. al, 1973, Ivanov, Minchenkova et. al., 1974).

В диссертационной работе были использованы водорастворимые катионные мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил)порфирин (ТОЕРуР4) и его Cu(II)- и Co(II) -содержащие аналоги (Cu(II)ТОЕРуР4 и Co(II)ТОЕРуР4), а также Cu(II)- и Co(II)-содержащие аналоги мезо-тетра-(4N-бутилпиридил)порфирина (Cu(II)TButPyP4 и Co(II)TButPyP4), синтезированные на кафедре фармакологической химии ЕМГУ проф. Робертом Казаряном.

Описаны основные методы исследования (абсорбционная спектроскопия, круговой дихроизм, метод плавления), которые используются для исследования комплексов.

Для расчета параметров связывания (константа связывания  $K_b$  и стехиометрия  $n$ ) было использовано модифицированное уравнение Макги и фон Хиппеля, предложенное Корреа и Чарлсом. (Correia J.J.,Chaires J.B., 1994),

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

где  $K_b$  – константа связывания,  $n$  – параметр исключения, выраженный в парах оснований,  $C_f$  – концентрация свободного лиганда (порфирина), а  $r = C_b / C_N$  отношение концентрации связанного лиганда к концентрации пар оснований.

Термодинамические параметры связывания ( $\Delta H_b$ ,  $\Delta G_b$ ,  $\Delta S_b$ ) порфиринов с ДНК были определены по зависимостям констант связывания от

температуры (метод Вант Гоффа). По полученным зависимостям  $\ln K_b$  от  $1/T$  можно рассчитать энтальпию связывания  $\Delta H_b$  по формуле

$$\Delta H_b = -R \left[ \frac{\partial \ln K_b}{\partial (1/T)} \right]_p \quad (2),$$

где  $R$  – газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура.

Для расчета свободной энергии Гиббса  $\Delta G_b$ , использовалось:

$$\Delta G_b = -RT \ln K_b \quad (3),$$

а энтропия связывания  $\Delta S_b$  рассчитывалась по формуле:

$$\Delta S_b = (\Delta H_b - \Delta G_b)/T \quad (4).$$

Для обработки и построения экспериментальных кривых использовалась программа Origin 7.0 (OriginLab Corporation). Для оцифровки кривых использовалась программа Graph2Digit 0.61 (© Вячеслав Плиско, <http://plsoft.narod.ru>).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

*Третья глава* диссертационной работы посвящена сравнительному исследованию взаимодействия водорастворимого мезо-тетра-(4N-оксизетилпиридил) порфирина ТОЕРуР4, CuТОЕРуР4 и CoТОЕРуР4 с А-ДНК и В-ДНК в условиях низких ионных сил.

На рисунке 1(а) и 1(б) приведены спектры поглощения комплексов ТОЕРуР4 с различными концентрациями А-ДНК и В-ДНК при ионной силе  $[Na^+]=0.001M$ ,  $25^\circ C$ . Аналогичные спектры снимались и для комплексов CuТОЕРуР4 и CoТОЕРуР4 с А- и В-ДНК (рисунки не приведены). Как видно из рис.1(а, б), добавление ДНК к раствору порфирина ТОЕРуР4 приводит к красному сдвигу ( $\Delta\lambda$ ) максимума полосы поглощения Soret и к его гипохромизму ( $\Delta h$ ) для обеих форм ДНК.

Из литературы известно, что в условиях достаточно высоких ионных сил ( $[Na^+]=0.2M$  и  $0.02M$ ) большой красный сдвиг и сильный гипохромизм, характерен для интеркаляционного механизма связывания, а небольшое красное смещение полосы Soret и маленькая гипохромность характерны для внешнего связывания порфиринов со стабильной В-формой ДНК (Hui et. al., 1990; Lee et. al. 2001). При низких ионных ( $[Na^+]=0.001M$ ) условиях, как видно из рис.1, смещение максимума и гипохромизм полосы Soret при связывании ТОЕРуР4 соответственно равны: с А-ДНК  $\Delta\lambda = 7$  нм и  $\Delta h \sim 35.2\%$ , а с В-ДНК  $\Delta\lambda = 13$  нм, а  $\Delta h \sim 43.1\%$ . Для CuТОЕРуР4 эти параметры равны:  $\Delta\lambda = 9$  нм,  $\Delta h \sim 31.2\%$  для А-ДНК и  $\Delta\lambda = 5$  нм, а  $\Delta h \sim 45.1\%$  для В-ДНК. Для CoТОЕРуР4:  $\Delta\lambda=1$ нм и  $\Delta h \sim 19.1\%$  для А-ДНК и  $\Delta\lambda=2$ нм и  $\Delta h \sim 13.5\%$ , для В-ДНК. Однако только на основании величин смещения и гипохромизма невозможно сделать однозначный вывод о типе связывания порфиринов с А-ДНК.

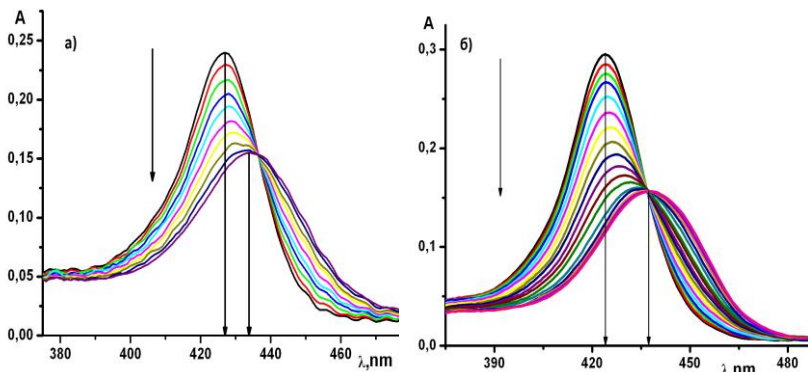


Рис.1. Спектры поглощения (полоса Core) ТОЕРуР4/А-ДНК(а) и ТОЕРуР4/В-ДНК(б), при ионной силе  $[Na^+]=0.001M$ ,  $25^{\circ}C$ ,  $pH$  7.1. Концентрация порфирина  $10^{-6}M$ . Концентрация добавляемого маточного раствора А- и В-ДНК  $\sim 1.5-4.5 \cdot 10^{-4} M$  пар оснований/mL.

Поскольку на спектрах титрования комплексов при низких концентрациях добавляемой ДНК наблюдается изобестическая точка, мы полагаем, что при этих концентрациях реализуется один механизм взаимодействия и по формуле (1) можно посчитать константу связывания ( $K$ ) и стехиометрию ( $n$ ) порфиринов с А- и В-формами ДНК. Для этого используя данные оптического поглощения (рис.1) были построены изотермы связывания (зависимости изменения оптической плотности от относительной концентрации порфирина) для каждого комплекса с А-ДНК и В-ДНК. Рассчитанные параметры исследуемых порфиринов с А-ДНК и В-ДНК приведены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры связывания ТОЕРуР4, CuТОЕРуР4 и CoТОЕРуР4 с разными формами ДНК при ионной силе  $[Na^+]=0.001M$ ,  $25^{\circ}C$ ,  $pH$  7.1

Порфирин	Форма ДНК	$K_b \times 10^7, M^{-1}$	$n$
ТОЕРуР4	А	$13.2 \pm 0.61$	$1.2 \pm 0.02$
	В	$6.1 \pm 0.14$	$1.1 \pm 0.01$
CuТОЕРуР4	А	$37.8 \pm 0.11$	$1.5 \pm 0.011$
	В	$15.9 \pm 0.2$	$1 \pm 0.002$
CoТОЕРуР4	А	$2.6 \pm 0.72$	$1.3 \pm 0.03$
	В	$3.8 \pm 0.87$	$1.1 \pm 0.05$



Как видно из таблицы 1, константы связывания ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4 с А-ДНК вдвое больше, чем с В-ДНК. Отсюда следует, что эти порфирины лучше взаимодействуют с А-ДНК, чем с В-ДНК. Значения констант связывания СоТОЕРуР4 с обоими формами ДНК почти одинаковы, но существенно меньше, чем для интеркалирующих порфиринов ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4. Это может свидетельствовать в пользу внешнего связывания СоТОЕРуР4 с обоими формами ДНК.

Для определения предпочтительного механизма связывания исследуемых порфиринов с А- и В- формами ДНК нами были проанализированы спектры индуцированного кругового дихроизма этих комплексов (ИКД) в видимой области спектра, где ДНК прозрачна, а наблюдаемые эффекты обусловлены асимметрией упаковки порфирина на ДНК. Из литературы известно, что по знаку ИКД спектра можно судить о механизме связывания порфиринов с ДНК: положительный ИКД - признак внешнего связывания, а отрицательный – интеркаляции (Fiel R.J. et.al,1978, Pasternack R.F.et.al,1996). При высоких концентрациях порфиринов на спектрах ИКД интеркалирующих порфиринов наряду с отрицательной полосой может появиться и положительная полоса. Принято считать, что бисигнальный ИКД спектр характеризует оба типа взаимодействия.

На рис.2 приведены спектры КД комплексов ТОЕРуР4 с А- и В-ДНК при различных значениях  $r$  относительной концентрации порфирина.

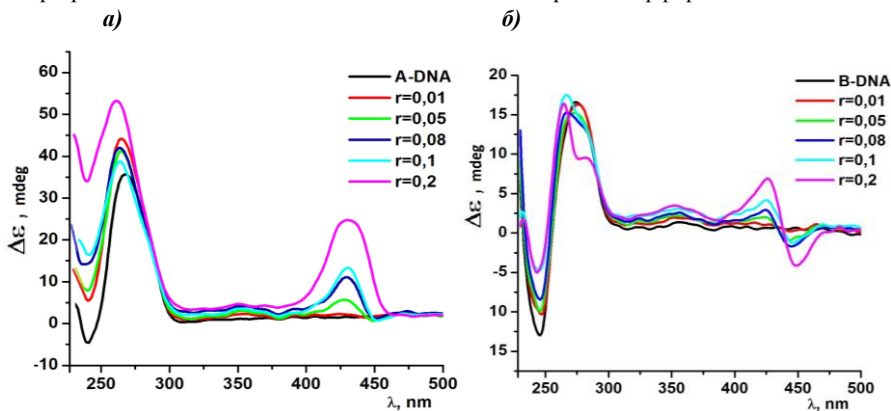


Рис.2. Спектры кругового дихроизма ТОЕРуР4 порфирина с А-ДНК (а) и В-ДНК (б) при ионной силе  $[Na^+]=0.001M$ , 25 °С, рН 7.1. Концентрации А- и В- ДНК в эксперименте одинаковы и равны  $\sim 7.5 \cdot 10^{-5} M$  пар оснований/ $mL$ . Относительная концентрация добавляемого порфирина ( $r$ ) указана на рисунках.

Добавление ТОЕРуР4 порфирина к А-ДНК приводит к появлению положительного ИКД спектра в интервале 400-470 нм. С увеличением относительной концентрации порфирина интенсивность этой положительной полосы растет, но форма спектра не меняется. Подобный характер изменения

спектров ИКД свидетельствует о том, что порфирин предпочитает только внешнее связывание с А-формой ДНК (внешнее стопкообразное связывание). В отличие от этого ИКД спектры ТОЕРуР4/В-ДНК (рис.26) имеют консервативный характер - характеризуются двумя (положительной и отрицательной) слабыми полосами с почти одинаковой интенсивностью, форма которой не меняется с увеличением концентрации порфирина. Появление бисигнального ИКД спектра у порфирин/В-ДНК комплекса свидетельствует о том, что интеркаляционный тип связывания также возможен при образовании данного комплекса.

На рисунке 3 приведены спектры кругового дихроизма CuТOЕРуР4/А-ДНК(а) и CuТOЕРуР4/В-ДНК(б) при различных значениях  $r$  относительной концентрации порфирина. Как видно из рисунка спектры ИКД комплексов CuТOЕРуР4/А-ДНК (рис.3а) и CuТOЕРуР4/В-ДНК (рис.3б) сильно отличаются. С увеличением концентрации порфирина CuТOЕРуР4 в растворе А-ДНК слабая отрицательная полоса ИКД спектра исчезает, а положительная сильно растет (до значений  $r=0.3$ ) (рис.3а). Это является признаком сильного внешнего связывания порфирина с А-ДНК.

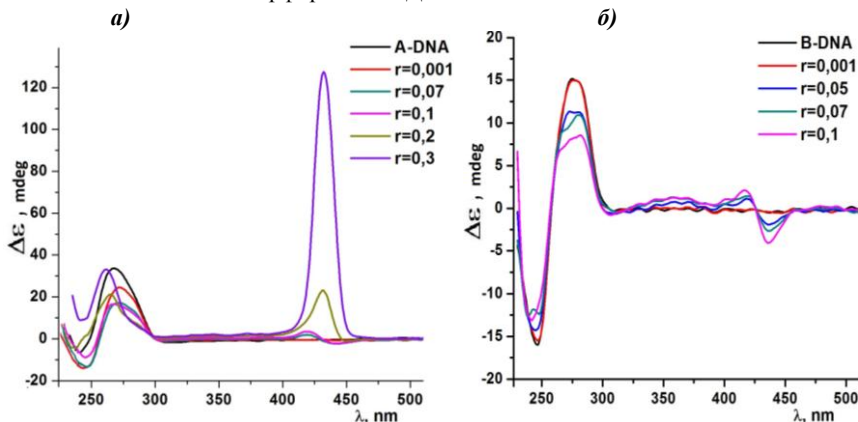


Рис.3. Спектры кругового дихроизма CuТOЕРуР4 порфирина с А-ДНК (а) и с В-ДНК (б) при ионной силе  $[Na^+]=0.001M$ , 25 °С, рН 7.1. Концентрации А- и В- ДНК в экспериментах одинаковы и равны  $\sim 7.5 \cdot 10^{-5} M$  пар оснований/ $mL$ . Относительная концентрация добавляемого порфирина ( $r$ ) указана на рисунках.

На основании анализа ИКД спектров можно заключить, что CuТOЕРуР4 предпочитает связываться с А-ДНК путем интеркаляции при малых относительных концентрациях, а при больших значениях относительной концентрации  $r$  происходит и внешнее связывание. С В-ДНК связывание происходит, в основном путем интеркаляции.

На рисунке 4 приведены спектры КД СоТOЕРуР4/А-ДНК (а) и СоТOЕРуР4/В-ДНК(б) комплексов при различных значениях относительной

концентрации  $\gamma$ . Из рисунка видно, что на ИКД спектрах СоТОЕРуР4/А-ДНК(а) и СоТОЕРуР4/В-ДНК(б) комплексов наблюдается только одна положительная полоса. С увеличением относительной концентрации порфирина до  $\gamma=0.3$  интенсивность этой полосы растёт, а форма спектра не меняется. При относительной концентрации порфирина  $\gamma=0.3$  происходит агрегация ДНК-порфирина комплекса. Полученный результат свидетельствует о том, что СоТОЕРуР4 взаимодействует как с А-ДНК, так и с В-ДНК только путем внешнего связывания.

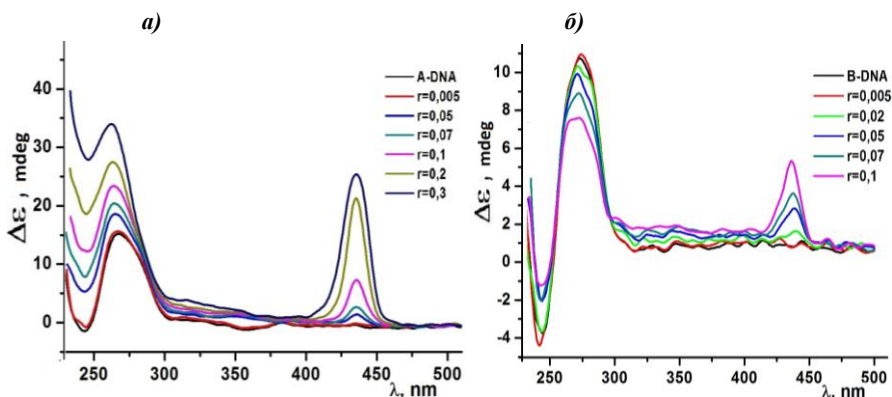


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма СоТОЕРуР4 порфирина с А-ДНК (а) и с В-ДНК(б), при ионной силе  $[Na^+]=0.001M$ ,  $25^\circ C$ ,  $pH 7.1$ . Концентрации растворов А- и В- ДНК в эксперименте одинаковы и равны  $\sim 7.5 \cdot 10^{-5} M$  пар оснований/ $mL$ . Относительная концентрация добавляемого порфирина ( $\gamma$ ) указана на рисунках.

Основным критерием термодинамической стабильности ДНК-порфирина комплекса является величина изменения свободной энергии Гиббса ( $\Delta G_b$ ). Изменение свободной энергии Гиббса имеет энтальпийную ( $\Delta H_b$ ) и энтропийную ( $\Delta S_b$ ) составляющие, по изменению которых можно сделать вывод о механизме связывания порфиринов с А-и В-формами ДНК. Термодинамические параметры связывания порфиринов с ДНК определялись методом Вант Гоффа. Для этого проводилось спектрофотометрическое титрование порфиринов с А- и В-ДНК при четырех температурах 20, 25, 30 и  $35^\circ C$  (при которых ДНК находится в двуспиральном состоянии) и строились зависимости логарифма константы связывания  $\ln(K_b)$  от обратной температуры ( $1/T$ ) (рис.5). Затем по наклону прямых по формуле (2) определяли энтальпию связывания ( $\Delta H_b$ ). Свободную энергию Гиббса ( $\Delta G_b$ ) и энтропию связывания ( $\Delta S_b$ ) определяли по формулам (3) и (4).

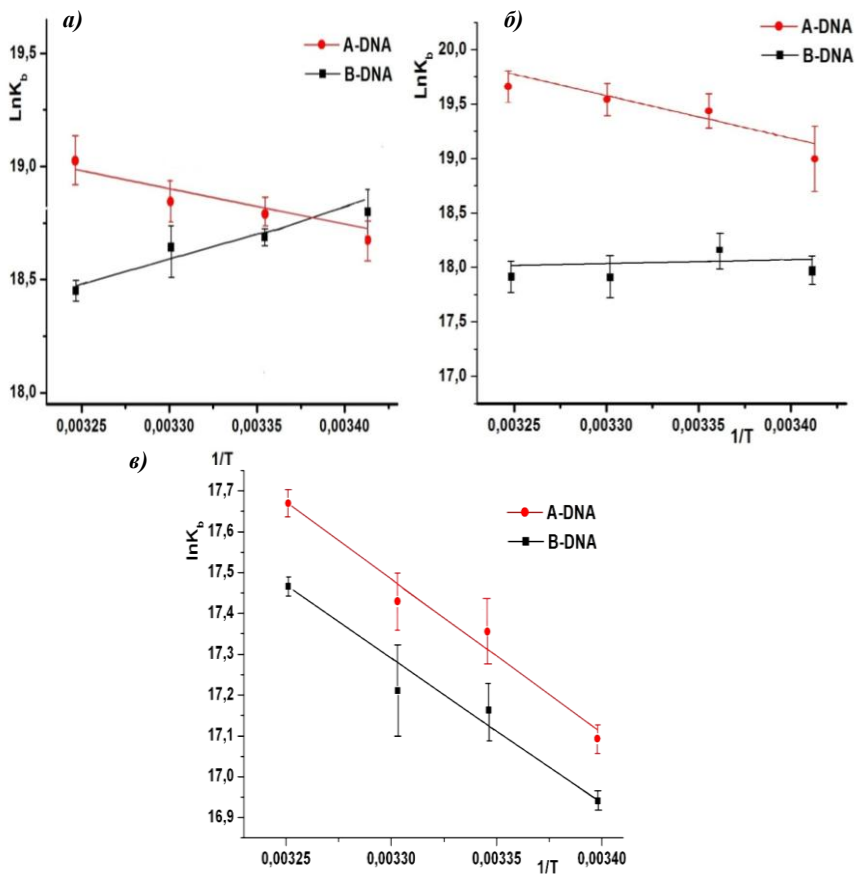


Рис.5 Зависимость логарифма константы связывания ТОЕРуР4(а), CuТОЕРуР4(б) и CoТОЕРуР4(в) с А- и В-ДНК, от обратной температуры, ионная сила  $[Na^+]=0.001M$ ,  $25^\circ C$ , pH 7.1.

Результаты расчетов суммированы на рисунке 6. Анализ диаграммы на рис.6 позволяет сделать общие выводы по изменению  $\Delta G$  всех порфиринов: 1) они практически одинаковы ( $\sim 11$  ккал/моль) и 2) не зависят от формы спирали ДНК (А или В). Но энтропийная ( $\Delta S$ ) и энтальпийная ( $\Delta H$ ) составляющие свободной энергии ( $\Delta G$ ) для интеркалирующих и связывающихся внешне порфиринов сильно отличаются. В условиях низких ионных сил ( $[Na^+]=0.001M$ ) при взаимодействии с В-формой ДНК для интеркалиаторов (ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4) характерны небольшие отрицательные значения энтальпии  $\Delta H$ , и выгодные существенно большие значения  $\Delta S$ .

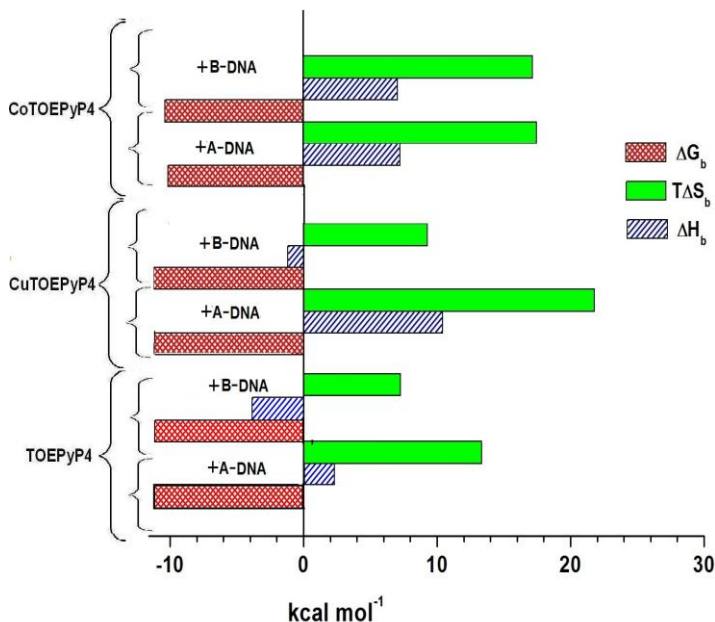


Рис. 6. Диаграмма распределения энергии при комплексобразовании порфиринов с А- и В- формами ДНК.

При взаимодействии с А-формой ДНК для интеркаляторов (ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4) характерны положительные значения  $\Delta H$  и примерно вдвое большие положительные значения  $\Delta S$ . А для связывающегося внешне СоТОЕРуР4 характерны положительные значения  $\Delta H$  и большие положительные значения  $\Delta S$ . Положительные значения энтальпии свидетельствуют о невыгодности интеркаляционного способа связывания порфиринов, а положительные значения энтропии свидетельствуют о предпочтительном внешнем связывании порфиринов, поскольку могут быть следствием интенсивного вытеснения связанной воды и катионов из бороздок ДНК в раствор при связывании (Chaires et, al., 1997, Naq et, al., 2002). Следовательно, можно утверждать, что при низких ионных условиях взаимодействие ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4 с В-ДНК происходит двумя механизмами: интеркаляцией и внешним связыванием, а с А-ДНК в основном происходит путем внешнего связывания. Взаимодействие СоТОЕРуР4 с обоими А- и В-формами ДНК имеет выраженный энтропийный характер и происходит путем внешнего связывания.

**В 4.1 и 4.2 четвертой главы** диссертационной работы проведено сравнительное исследование взаимодействия порфиринов с В-формой ДНК при разных ионных условиях ( $0.001M < [Na^+] < 0.02M$ ). Используя данные оптического поглощения были построены изотермы связывания ТОЕРуР4/В-ДНК, CuTButPyP4/В-ДНК и СоTButPyP4/В-ДНК комплексов и были рассчитаны параметры связывания ( $K$ ) и стехиометрия ( $n$ ) (табл.2).

Таблица 2. Параметры связывания ТОЕРуР4, CuTButPyP4 и CoTButPyP4с В-ДНК при разных ионных силах, 25 °С, рН 7.1.

Порфирин	[Na <sup>+</sup> ], М	K <sub>b</sub> x 10 <sup>7</sup> М <sup>-1</sup>	n
ТОЕРуР4	0.001	6.1±0.14	1.1±0.01
	0.02	3.5±0.3	2.3±0.02
	0.2	0.2±0.3	5±0.3
CuТОЕРуР4	0.001	15.9±0.2	1±0.02
CuTButPyP4	0.02	8.44±0.15	0.97±0.04
	0.2	2.34±0.1	1.5±0.2
CoТОЕРуР4	0.001	0.38±0.08	1.1±0.05
CoTButPyP4	0.02	0.347±0.03	1.03±0.1
	0.2	0.014±0.002	5.4±0.2

Как видно из таблицы 2, константа связывания с В-ДНК Cu-содержащих порфиринов более, чем в 20 раз больше константы связывания Со-содержащих при одинаковых ионных силах. Кроме того как видно из таблицы, увеличение ионной силы приводит к уменьшению K<sub>b</sub> и увеличению n для исследуемых комплексов. А это значит, что увеличение ионной силы приводит к ослаблению интеркаляционного способа связывания и усилению внешнего связывания порфиринов с В-ДНК.

Для установления предпочтительного механизма связывания CuTButPyP4 (а) и CoTButPyP4(б) порфиринов с В-ДНК при ионных силах [Na<sup>+</sup>]=0.02М и [Na<sup>+</sup>]=0.2М, нами были получены и проанализированы также спектры ИКД (спектры не приведены).

Анализ ИКД спектров CuTButPyP4/В-ДНК комплекса показывает, что при низких ионных силах Cu-содержащий порфирин взаимодействует с ДНК преимущественно путем интеркаляции (отрицательная полоса ИКД), но с увеличением ионной силы наблюдается сдвиг равновесия в сторону внешнего связывания (спектр становится бисигнальным).

На спектрах ИКД CoTButPyP4/В-ДНК комплекса наблюдается только одна положительная положительная полоса (внешнее связывание), которая с увеличением концентрации CoTButPyP4 растет до некоторого максимального значения, т.е. характер связывания Со-порфирина с ДНК практически не меняется с ионной силой.

**В 4.3** рассматривается влияние двухвалентных ионов Mn<sup>2+</sup> на плавление ДНК-порфирин комплексов. Известно, что при низких концентрациях двухвалентные ионы играют роль противоионов, приводя к стабилизации структуры ДНК путем экранирования отрицательного заряда фосфатных групп (эффект достигает насыщения при концентрации υ=0.5М/Р, когда 1 ион связывает как скрепка две соседние фосфатные группы). При более высоких концентрациях они начинают взаимодействовать с азотистыми

основаниями, приводя к дестабилизации двойной спирали ДНК. На рисунке 10 приведены кривые плавления CuTButPyP4/ДНК (а) и CoTButPyP4/ДНК (б) комплексов без ионов  $Mn^{2+}$  и при  $\nu=0.5$  М/Р ионов  $Mn^{2+}$ . Добавление  $\nu=0.5$  ионов  $Mn^{2+}$  к буферному раствору приводит к полному экранированию фосфатных групп ДНК. При этом желобки ДНК остаются свободными, что создает благоприятные условия для интеркаляции порфиринов.

Как видно из рисунка рис.7 в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ , оба (Cu- и Co-) - содержащих порфирина сильнее стабилизируют структуру ДНК, чем без нее. Кроме того можно заметить, что с увеличением концентрации обоих порфиринов существенно изменяется конец кривых плавления, что соответствует выплавлению GC-богатых участков ДНК. Для CuTButPyP4 такой характер изменения кривой плавления рис.7(в) вполне ожидаемый и подтверждает интеркаляционный характер связывания этого порфирина, происходящий в GC-богатых участках ДНК. Но наличие аксиального лиганда в CoTButPyP4 исключает полную интеркаляцию этого порфирина в ДНК из-за его "толщины" (~ 5 Å). Мы предполагаем, что наблюдаемые эффекты на кривых плавления комплексов CoTButPyP4/ДНК (рис.7(г)), являются результатом полуинтеркаляционного механизма взаимодействия, когда одно из периферийных колец порфирина встраивается между парами азотистых оснований ДНК, а центр порфирина остается на поверхности ДНК.

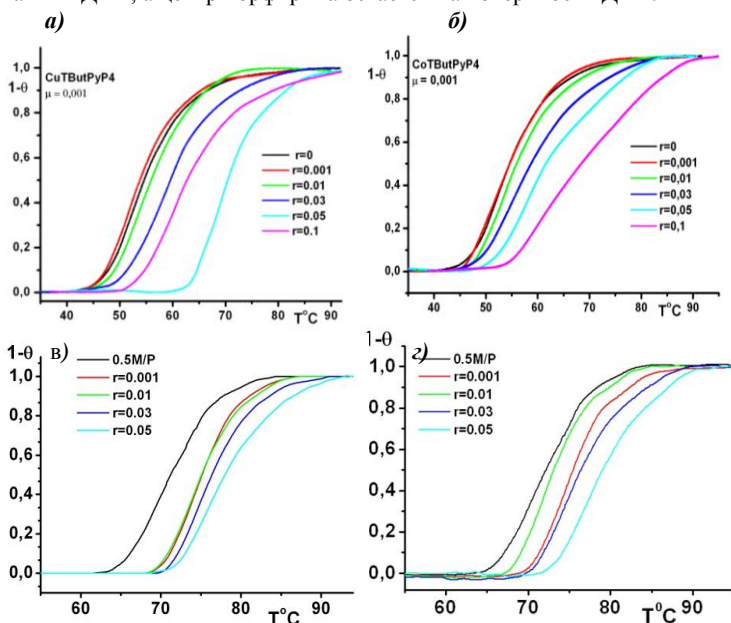


Рис.7. Кривые плавления CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов без ионов  $Mn^{2+}$  (а и б) и в присутствии ионов  $\nu=0.5$ М/Р  $Mn^{2+}$  (в и г),  $[Na^+]=0.001$ М, рН 7.1.

По кривым плавления были определены энтальпия ( $\Delta H$ ) и энтропия ( $\Delta S$ ) перехода спираль-клубок для комплексов CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК (Frank-Kamenetskii M.D., Karapetian A.T., 1972). с помощью формул (5)

$$\Delta H = \frac{\delta(\Delta T)}{(\delta T_m)^2} \cdot T_0^2 \cdot r, \quad \Delta S = \frac{\Delta H}{T_0}$$

$$\delta(\Delta T) = \Delta T_m - \Delta T_0, \quad \delta T_m = T_m - T_0,$$

где  $r = [\text{порфирина}]/[\text{ДНК}]$  и  $r \ll 1$ ,  $T_m$  и  $\Delta T_m$  - температура и ширина интервала плавления комплексов ДНК с порфирином при определенных значениях  $r$ , а  $T_0$  и  $\Delta T_0$  те же параметры, но без порфирина. Результаты расчетов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Термодинамические параметры CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов при наличии  $\nu = 0.5 \text{ M/P}$  ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в растворе.

<b>CuButPyP4/DNA</b>				
<b>r = [P]/[DNA]</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>ΔT</b>	<b>ΔH (ккал/моль)</b>	<b>ΔS (ккал/моль·К)</b>
0.001	75.45	6.3	-0.94±0.02	-0.01±0.001
0.01	75.5	7.4	-3.83±0.15	-0.05±0.002
0.03	77.1	7.5	-4.56±0.10	-0.06±0.002
0.05	78	10.2	15.49±0.20	0.21±0.01
0.1	81.3	11	17.62±0.30	0.24±0.02
<b>CoButPyP4/DNA</b>				
0.001	75.4	8.0	-0.11±0.02	-0.001±0.0005
0.01	73.2	7.4	-20.97±0.3	-0.029±0.03
0.03	76.4	9.4	5.35±0.4	0.074±0.01
0.05	79.1	9.8	4.41±0.3	0.061±0.015
0.1	81.4	9.6	4.34±0.3	0.06±0.015

Отрицательные изменения энтальпии при низких значениях  $r$  (таблица 3) свидетельствуют о том, что CuTButPyP4 порфирина взаимодействует путем интеркаляции. При более высоких значениях  $r$  изменения энтальпии становятся положительными (невыгодными), что свидетельствует, что тот же самый порфирина взаимодействует с ДНК внешним способом. Отрицательные значения  $\Delta H$  при низких соотношениях  $r=0.001$  и  $r=0.01$  для CoTButPyP4/ДНК комплекса, подтверждают наши предположения о полуинтеркаляционном способе связывания этого порфирина. Во всех остальных случаях CoTButPyP4 взаимодействует путем внешнего связывания. Эти результаты согласуются с данными, полученными при анализе ИКД спектров исследуемых комплексов.



## ВЫВОДЫ

1. На основании спектральных исследований впервые проведен полный термодинамический анализ связывания  $\text{TOEPyP4}$ ,  $\text{CuTOEPyP4}$  и  $\text{CoTOEPyP4}$  с А-формой ДНК. Для всех соединений получены значения  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ .
2. Установлено, что в условиях низких ионных сил изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) имеет практически одинаковое значение ( $\sim 11$  ккал/моль) при связывании всех порфиринов с А- и В-формами ДНК.
3. Показано, что существует корреляция между изменением термодинамических потенциалов и способом связывания порфиринов: отрицательное значение энтальпии связывания ( $\Delta H$ ) характеризуют интеркаляционный способ связывания, в то время как положительные  $\Delta H$  и большие значения  $\Delta S$  характеризуют внешнее связывание.
4. Увеличение ионной силы приводит к уменьшению константы связывания с ДНК всех порфиринов.
5. Увеличение концентрации ионов  $\text{Na}^+$  приводит к ослаблению интеркаляционного способа связывания и усилению внешнего связывания плоских  $\text{TOEPyP4}$  и  $\text{CuTOEPyP4}$  порфиринов с В-ДНК, а связывание с В-ДНК имеющего аксиальный лиганд Со-порфирина слабо зависит от ионной силы.
6. Температура плавления комплексов  $\text{CuTButPyP4}$  и  $\text{CoTButPyP4}$  с ДНК в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  на 15-20 °С выше, чем без ионов.
7. В присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в растворе взаимодействие низких концентраций  $\text{CoTButPyP4}$  с ДНК происходит методом полуинтеркаляции, а  $\text{CuTButPyP4}$  - методом интеркаляции, а при более высоких концентрациях оба порфирина предпочитают внешнее связывание.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. G. Ananyan, A. Avetisyan, Y. Dalyan. //The comparative study of CuTAIPyP4 and CoTAIPyP4 porphyrins with DNA.// JBSD, Albany, The 16<sup>th</sup> Conversation, Vol.26, No.6(174), p.901-902, 2009.
2. A. Avetisyan, G. Ananyan, A. Ghazaryan, L. Aloyan, Y. Dalyan. //The comparative study of CuTButPyP4 and CoTButPyP4 porphyrins with DNA.// Int. Conf. “ Biotechnology and health-3” & DAAD Alumni seminar, p. 122, 2009.
3. G. Ananyan, A. Avetisyan, L. Aloyan, Y. Dalyan. //The stability of DNA-porphyrin complexes in presence of Mn(II) Ions.// An. Int. Symposium on "Solvation and Ionic Effects in Biomolecules: Theory to Experiment", p. 37-38, 2010.
4. G. Ananyan, A. Avetisyan, L. Aloyan, Y. Dalyan. //The stability of DNA-porphyrin complexes in presence of Mn(II) ions.// Biophysical Chemistry No.156, p. 96-101, 2011.
5. A. Avetisyan.// Interaction of TOEPyP4 porphyrin with A form of DNA.// Proceedings of the Yerevan state University, Physical and Mathematical Science , No.3, p.43-48. 2014.
6. A. Avetisyan, Y. Dalyan. //Thermodynamics of interactions of CoTOEPyP4 porphyrin with A-DNA.// Proceedings of the Yerevan state University, Chemical and Biological Sciences, No. 3, p. 40-45, 2014.
7. A. Avetisyan, Y. Dalyan. //The Comparative Study of H<sub>2</sub>TOEPyP4 and CoTOEPyP4 Porphyrins with A-DNA.// JBSD, Albany, The 19<sup>th</sup> Conversation, Vol.33, No.S1, p.87, 2015.
8. A. Avetisyan, Y. Dalyan. //The Comparative Study of CuTOEPyP4 Porphyrin with A- and B- forms of DNA.// Int. Symposium and Young Scientist School on Disordered and Ordered Materials Analysis and Characterization. p.85-86, 2015.

## ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ ԱՆԻ ԱՐԹՈՒՐԻ

### ԴՆԹ-ի A-Ձեպի ՀԵՏ ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶՂԵՑՈՒԹՅԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

#### ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ԴՆԹ, կոնֆորմացիա, պորֆիրին, փոխազդեցության մեխանիզմներ, ինտերկալացիա, պարույր-կծիկ անցում, իոնական ուժ, թերմոդինամիկական պարամետրեր:

Ներկայացվող ատենախոսության մեջ ուսումնասիրված է բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ օժտված կատիոնային մեզո-տետրա-[4N-օքսիէթիլպիրիդիլ] պորֆիրինի (TOEPyP4) և նրա Cu(II)-, Co(II)-մետաղական ածանցյալների (CuTOEPyP4 և CoTOEPyP4) փոխազդեցության առանձնահատկությունները ԴՆԹ-ի A-ձևի հետ, ինչպես նաև իրականացվել է այդ փոխազդեցությունների համեմատական ուսումնասիրությունը B-ԴՆԹ-ի հետ: Առաջին անգամ իրականացվել է A-ԴՆԹ-ի հետ TOEPyP4, CuTOEPyP4 և CoTOEPyP4 պորֆիրինների փոխազդեցության ամբողջական ջերմադինամիկական ուսումնասիրություն: Ցույց է տրվել, որ A- և B- ձևի ԴՆԹ- երի հետ ուսումնասիրվող պորֆիրինների փոխազդեցության ազատ էներգիան պրակտիկորեն նույնն է: Ցույց է տրվել, որ գոյություն ունի որոշակի կապ ջերմադինամիկական պարամետրերի և փոխազդեցության մեխանիզմների միջև: Հաստատվել է, որ էնթալպիայի բացասական փոփոխությունը բնորոշ է փոխազդեցության ինտերկալացիոն մեխանիզմին, իսկ արտաքին փոխազդեցությանը բնորոշ են էնթալպիայի( $\Delta H$ ) դրական փոփոխությունը և էնտրոպիայի( $\Delta S$ ) մեծ արժեքները:

Ուսումնասիրվել են ԴՆԹ-պորֆիրին փոխազդեցության մեխանիզմները կախված միջավայրի իոնական ուժից: Ցույց է տրվել, որ իոնական ուժի մեծացումը բերում է ԴՆԹ - պորֆիրին կոմպլեքսների կապման հաստատունների փոքրացմանը: Հաստատվել է, որ  $[Na^+]$  իոնների կոնցենտրացիայի աճը ուղեկցվում է TOEPyP4 և CuTOEPyP4 պորֆիրինների փոխազդեցության ինտերկալացիոն մեխանիզմի թուլացմամբ, և ավելի հավանական է դառնում արտաքին փոխազդեցության մեխանիզմը, մինչդեռ CoTOEPyP4 պորֆիրինի փոխազդեցության մեխանիզմը ԴՆԹ-ի հետ (արտաքին կապում) թույլ է կախված իոնական ուժից:

Հետազոտվել են նաև  $\text{ԴՆԹ}/\text{Cu(II)TButPyP4}$  և  $\text{ԴՆԹ}/\text{Co(II)TButPyP4}$  կոմպլեքսառաջացման առանձնահատկությունները  $\text{Mn}^{2+}$ -ի երկվալենտ իոնների առկայությամբ: Ցույց է տրվել, որ  $\text{Cu(II)}$  - պորֆիրինի դեպքում իրականանում է փոխազդեցության երկու մեխանիզմ՝ ինտերկալացիա և արտաքին կապում: Չնայած արքիալ լիզանդի առկայությանը՝  $\text{Co(II)}$ -պորֆիրինի փոքր քանակությունների դեպքում հնարավոր է մասնակի ինտերկալացա, այսինքն պորֆիրինի կողմնային ռադիկալն է ներթափանցում  $\text{ԴՆԹ}$ -ի հարևան հիմնային զույգերի միջև, իսկ ավելի մեծ քանակությունների դեպքում՝ իրականանում է արտաքին փոխազդեցություն:

Հետազոտվել են նաև  $\text{ԴՆԹ}/\text{Cu(II)TButPyP4}$  և  $\text{ԴՆԹ}/\text{Co(II)TButPyP4}$  կոմպլեքսների կայունությունը ջերմային դենատուրացիայի մեթոդով: Ցույց է տրվել, որ  $\text{Mn}^{2+}$ -ի իոններով  $\text{ԴՆԹ}$ -ի ամբողջական էկրանավորման դեպքում (մեկ  $\text{Mn}^{2+}$ -ի իոնին բաժին է ընկնում երկու ֆոսֆատային խումբ),  $\text{ԴՆԹ}$ -պորֆիրին կոմպլեքսների կայունացումը ավելի վառ է արտահայտված ( $15^\circ\text{C}$  -  $20^\circ\text{C}$ ), քան բացակայության դեպքում: Որոշվել է նաև այդ կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման էնթալպիան ( $\Delta H$ ) և էնտրոպիան ( $\Delta S$ )  $\text{Mn}^{2+}$ -ի իոնների առկայության և բացակայության դեպքում:

AVETISYAN ANI

THE FEATURES OF THE INTERACTION OF THE  
PORPHYRINS WITH A-CONFORMATION OF DNA

SUMMARY

Keywords: DNA, conformation, porphyrin, binding mechanism, intercalation, helix-coil transition, ionic strength, thermodynamic parameters.

The specific features of the interaction of the cationic meso-tetra-[4N-oxyethylpyridyl] porphyrin (TOEPyP4) and its Cu(II)- and Co(II)-derivatives (CuTOEPyP4 and CoTOEPyP4) with A-conformation of DNA are presented in the dissertation. A comparative study of the interaction of porphyrins with B-form of DNA was carried out as well. For the first time the complete thermodynamic study of the interaction of TOEPyP4, CuTOEPyP4 and CoTOEPyP4 porphyrins with A-DNA was obtained. It was shown that the free energy of interaction of porphyrins with A- and B-forms of DNA is the same for all the investigated porphyrins. The correlation between thermodynamic parameters and the binding mode of the porphyrins to DNA was established. This correlation reflects that the negative binding enthalpy ( $\Delta H$ ) is characterized by an intercalation mode, while the positive enthalpy ( $\Delta H$ ) and the large values of the entropy ( $\Delta S$ ) are characterized by an external binding mode.

We have also studied the dependence of the interaction of these porphyrins with DNA on the ionic strength of the solution. Increasing the ionic strength of the solution leads to a decrease in the value of the binding constants of the investigated porphyrin-DNA complexes. It was shown that increasing the concentration of  $[Na^+]$  ions is accompanied by the weakening of the mechanism of intercalation for TOEPyP4 and CuTOEPyP4 porphyrins and the second mechanism, external binding mode, becomes more probable, while CoTOEPyP4-DNA interaction (external binding mode) is weakened depending on the ionic strength.

The features of the interaction of (Cu(II)- and Co(II)-) porphyrins with DNA in the presence of  $[Mn^{2+}]$  ions were studied. It was shown that Cu(II)-porphyrin interacts by two modes of interactions: intercalation and external binding mode. Despite the existence of an axial ligand at low relative concentrations of Co(II)-porphyrin, a semi-intercalation mechanism occurs, when peripheral groups of

porphyrin penetrate between the neighboring base pairs of DNA, while at relatively high concentrations only an external binding mode remains.

We have studied the thermal stability of the DNA/Cu(II)TButPyP4 and DNA/Co(II)TButPyP4 complexes for the case of complete screening of DNA by divalent  $[Mn^{2+}]$  ions (one  $[Mn^{2+}]$  ion per two phosphate groups of DNA) by melting curves. The stability of the investigated complexes in the presence of  $Mn^{2+}$  ions are more stable (15 °C - 20 °C) than the same complexes in absence of  $Mn^{2+}$  ions. The helix-coil transition enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ) of porphyrin - DNA complexes were determined in the presence and absence of divalent  $[Mn^{2+}]$  ions.



