

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Аветисян Ани Артуровна

**ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОРФИРИНОВ
С А-ФОРМОЙ ДНК**

Диссертация

На соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
по специальности «Биофизика» 03.00.02

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Е.Б.Далян

ЕРЕВАН – 2016

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1. Конформации ДНК в различных условиях	9
1.1.1. Структура и конформации ДНК.....	9
1.1.2. Гидратация и конформация ДНК.....	16
1.1.3. Ионная сила и конформация ДНК.....	24
1.2. Структура порфиринов и металлопорфиринов	27
1.3. Взаимодействие порфиринов и металлопорфиринов с ДНК	32
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Материалы	39
2.2. Методы	41
2.2.1. Абсорбционная спектроскопия.....	41
2.2.2. Круговой дихроизм.....	42
2.2.3. Плавление ДНК.....	44
2.3. Получение А-конформации ДНК	45
2.4. Расчет параметров связывания и термодинамика	47
2.4.1. Параметры связывания.....	47
2.4.2. Термодинамика связывания.....	49
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	52
ГЛАВА III. Особенности взаимодействия порфиринов с А-формой ДНК	52
3.1. Взаимодействие ТОЕРуР4 с А-формой ДНК	53
3.1.1. Спектры поглощения ТОЕРуР4-ДНК комплексов.....	53
3.1.2. Круговой дихроизм ТОЕРуР4-ДНК комплексов.....	54
3.1.3. Расчет параметров связывания ТОЕРуР4 с ДНК.....	56
3.2. Взаимодействие CuТОЕРуР4 с А-формой ДНК	58
3.2.1. Спектры поглощения CuТОЕРуР4-ДНК комплексов.....	58

3.2.2. Круговой дихроизм CuТОЕРуР4-ДНК комплексов.....	60
3.2.3. Расчет параметров связывания CuТОЕРуР4 с ДНК.....	62
3.3. Взаимодействие СоТОЕРуР4 с А-формой ДНК.....	63
3.3.1. Спектры поглощения СоТОЕРуР4-ДНК комплексов.....	63
3.3.2. Круговой дихроизм СоТОЕРуР4-ДНК комплексов.....	65
3.3.3. Расчет параметров связывания СоТОЕРуР4 с ДНК.....	67
3.4. Термодинамика связывания порфиринов с А- и В-формами ДНК.....	68
3.4.1. ТОЕРуР4-ДНК комплексы.....	69
3.4.2. CuТОЕРуР4-ДНК комплексы.....	71
3.4.3. СоТОЕРуР4-ДНК комплексы.....	73
3.4.4. Сравнительный термодинамический анализ полученных результатов....	76
ГЛАВА IV. Влияние ионной силы на комплексообразование порфирин- ДНК.....	79
4.1. Влияние ионной силы на ТОЕРуР4-ДНК взаимодействие.....	80
4.2. Влияние ионной силы на комплексообразование Cu- и Со-металлопорфиринов с ДНК.....	84
4.3. Влияние двухвалентных ионов Mn²⁺ на термостабильность ДНК-порфирин комплексов.....	91
4.3.1. Термодинамика комплексообразования	97
ВЫВОДЫ	100
ЛИТЕРАТУРА	101

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 типа 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 основной уотсон-криковской В-формы ДНК. Однако установлено, что в условиях пониженной влажности ДНК может принимать другую, менее стабильную А-форму. Этой форме биологи долго не придавали значения, поскольку она возникала не при физиологических условиях. Однако когда было установлено, что двуспиральные РНК и ДНК-РНК гибриды (образующиеся при транскрипции и репликации) в клетке 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. Проблема исследования взаимодействия порфиринов с А-формой высокомолекулярной ДНК в литературе до сих пор не рассматривалась. 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).

Поскольку опухолевые клетки, которые в первую очередь атакуются порфиринами, почти непрерывно находятся в стадии деления, то и ДНК в таких клетках достаточно часто будет принимать А-форму. Поэтому задача исследования особенностей взаимодействия потенциально противоопухолевых порфиринов с А-формой ДНК весьма актуальна.

В работе впервые исследовалось взаимодействие с А-формой ДНК водорастворимых мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (ТОЕРуР4) и его Cu(II)- и Co(II)-содержащих производных (CuТОЕРуР4 и CoТОЕРуР4), 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^{2+} .

Целью работы является определение механизмов связывания ТОЕРуР4, CuТОЕРуР4 и CoТОЕРуР4 порфиринов с А-ДНК, выявление зависимости способа связывания порфирина от конформации ДНК (А- или В-формы), проведение полного термодинамического анализа (определение ΔG , ΔH и ΔS) 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 порфиринов - 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 (ΔG_b), энтальпии (ΔH_b) и энтропии (ΔS_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 порфиринов/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. Исследованы особенности взаимодействия (Cu(II)- и Co(II)-) порфиринов с ДНК при наличии двухвалентных ионов Mn^{2+} . Определены энтальпия и энтропия перехода спираль-клубок для порфиринов/ДНК комплексов при полном экранировании ДНК ионами Mn^{2+} .

Основные положения, выносимые на защиту:

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

способ связывания, в то время как положительные ΔH и большие значения ΔS 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 $TOEPyP4$ и $CuTOEPyP4$ порфиринов с В-ДНК, а связывание имеющего аксиальный лиганд Co -порфирина (внешнее связывание) с В-ДНК слабо зависит от ионной силы.
5. При наличии ионов Mn^{2+} в растворе взаимодействие низких концентраций $CoTButPyP4$ с ДНК происходит методом полуинтеркаляции, а при более высоких концентрациях происходит внешнее связывание.
6. При наличии ионов Mn^{2+} в растворе взаимодействие низких концентраций $CuTButPyP4$ с ДНК происходит методом интеркаляции, а при более высоких концентрациях происходит 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 16th 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", Tsakhkadzor, Armenia, May 17-21, 2010.
- International Conference, The 19th 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.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Конформации ДНК в различных условиях

1.1.1. Структура и конформации ДНК

ДНК играет важную роль в хранении и экспрессии генетической информации в клетке. Она состоит из двух полинуклеотидных цепей. Каждая цепь закручена в спираль вправо, и обе они свиты вместе, т. е. закручены вправо вокруг одной и той же оси, образуя двойную спираль. Цепи антипараллельны. Каждая цепь ДНК состоит из сахарофосфатного остова, вдоль которого перпендикулярно оси двойной спирали располагаются основания. С химической точки зрения ДНК — это длинная полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков — нуклеотидов. Каждый нуклеотид ДНК содержит одно из четырёх азотистых оснований — гуанин (G), аденин (A) (пурины), тимин (T) и цитозин (C) (пиримидины), связанное с дезоксирибозой, к последней, в свою очередь, присоединена фосфатная группа. Состав нуклеотидов ДНК подчиняется правилам Чаргаффа: В любой ДНК содержание пуриновых нуклеотидов (A+G) всегда равно содержанию пиримидиновых нуклеотидов (T+C); число остатков A всегда равно числу остатков T, число остатков G – числу остатков C. При спаривании аденин (A) одной цепи всегда связывается с тимином (T) другой цепи двумя водородными связями, а гуанин (G) – с цитозином (C) тремя водородными связями. Основания, образующие пары, получили название комплементарных. Комплементарность последовательности оснований в полинуклеотидных цепях – ключевое свойство ДНК. Между собой соседние нуклеотиды соединены в цепи фосфодиэфирной связью, образованной 3'-гидроксильной (3'-ОН) и 5'-фосфатной группами (5'-PO₃). Это свойство обуславливает наличие полярности в ДНК, т. е. противоположной направленности: 5'-концу одной нити соответствует 3'-конец второй нити (рис.1) [1].

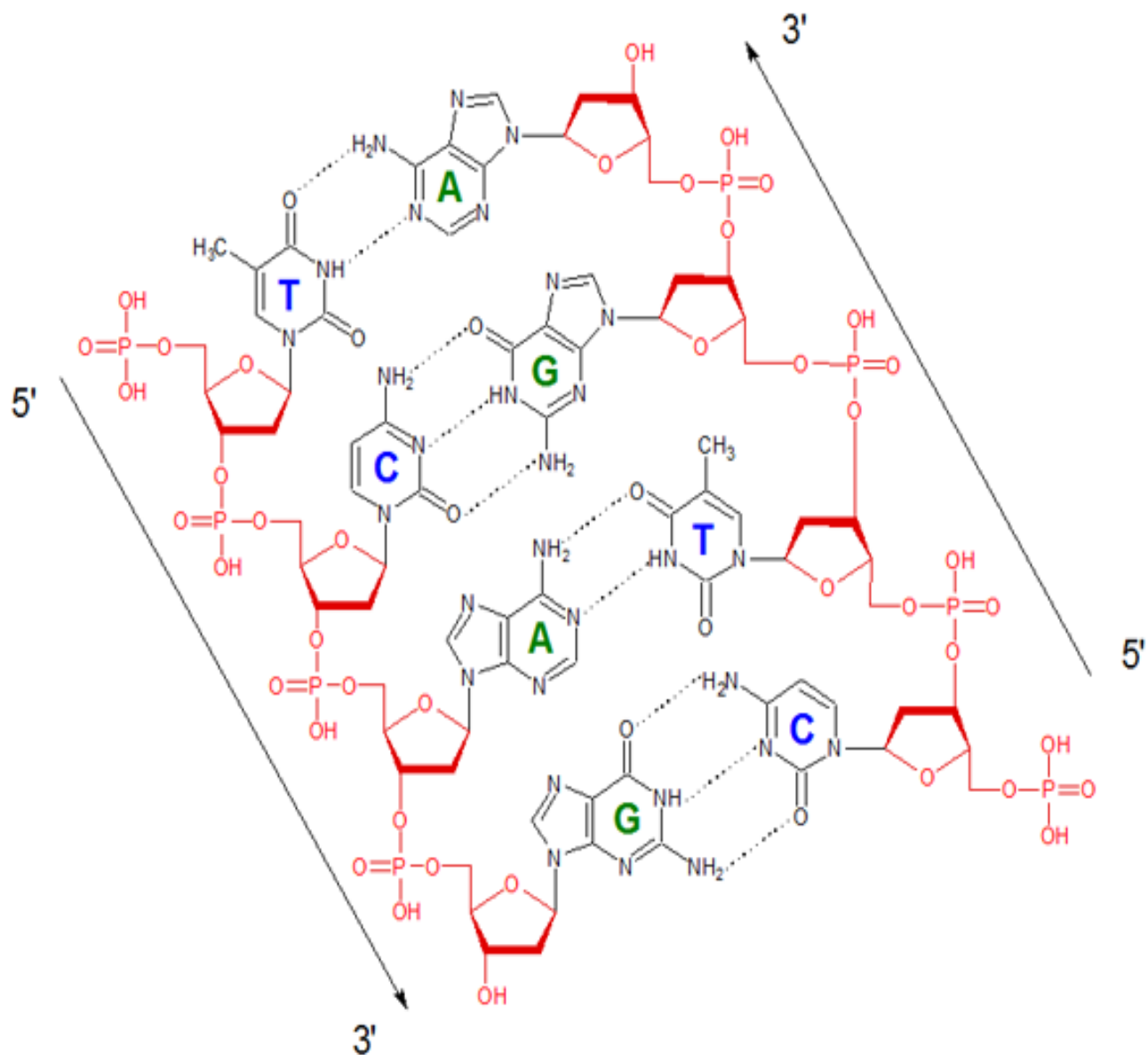


Рис.1. Участок молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), в которой нуклеотиды аденозин (А), гуанозин (G), тимин (Т) и цитидин (С) связаны с водородными связями, а друг с другом 3',5'-фосфодиэфирными связями. Направление цепи (5' → 3') отмечено стрелкой.

[<https://www.studyblue.com/notes/n/micro-205-study-guide-2012-13-dardis-/deck/9714840?blurry=e&ads=true>]

ДНК может находиться в различных конформационных состояниях. *B-форма* – наиболее распространенная форма ДНК. Это основная форма двухспиральной ДНК, в которой большая часть ее молекул существует в клетке. Пары оснований *B-формы* компланарны и перпендикулярны оси макромолекулы. Они уложены в стопкообразную структуру на расстоянии 3.4 Å друг от друга по оси спирали. А расстояние фосфат-фосфат вдоль цепи примерно 6 Å. Угол поворота между соседними парами равен 36°. В результате образуется правая двойная спираль с диаметром 22 Å и десятью парами оснований на виток. На поверхности спиральной структуры образуется два желобка - мажорный (глубина 8.5 Å, ширина 11.7 Å) и минорный (глубина 7.5 Å, ширина 5.7 Å) [2,3].

Вторичная структура стабилизируется двумя типами взаимодействий: водородными связями и стекинг-взаимодействиями.

Первый тип взаимодействия - это спаривание оснований между двумя нитями при которой образуются водородные связи между пуринами одной цепи и пиримидинами другой цепи (АТ и GC пары). В АТ-паре основания соединены двумя водородными связями, в GC-паре – тремя водородными связями, поэтому GC-пары существенно более стабильны. Водородные связи являются слабыми электростатическими взаимодействиями между одним электроотрицательным атомом (например, кислорода или азота), и атомом водорода, который присоединен к второму электроотрицательному атому. Водородные связи длиннее, чем ковалентные связи и значительно слабее. Энергия водородной связи составляет 1-10 ккал.мол⁻¹ при 25 °С, тогда как энергия ковалентной связи составляет 90 ккал.мол⁻¹ [4].

Второй тип взаимодействия наблюдается когда азотистые основания (являющиеся гидрофобными) в водном растворе располагаются стопками друг над другом, уменьшая тем самым контакт с молекулами воды. При образовании таких стопок функциональные группы одного основания вступают во взаимодействие с π-электронной системой соседнего с ним по вертикали

основания. "Вертикальные" π - π^* взаимодействия (стекинг-взаимодействия) обусловлены в основном ван-дер-ваальсовыми силами [5].

Как спаривание, так и укладка оснований важны для поддержания структуры двойной спирали полинуклеотида.

Конформация двойной спирали ДНК может изменяться при варьировании различных факторов: температуры, рН, концентрации ионов, кислотности раствора или связывания лиганда и т.д. [6, 7].

Двойная спираль ДНК подвергается различным структурным перестройкам, приводящим к появлению целого ряда форм: правых спиралей А(А-ДНК), В(В-ДНК), С(С-ДНК) и левой спирали Z(Z -ДНК). Известны два семейства форм правых спиралей ДНК: **В-** и **А-** семейства отличающиеся, в первую очередь, конформацией сахарного кольца [8]. Показано, что при физиологических условиях ДНК находится в В-форме, установленной Уотсоном и Криком.

А-форма ДНК. А-форма, как и В-форма ДНК является правой спиралью. Основное различие А- и В-форм ДНК состоит в конформации сахарного остатков. Если в В-форме ДНК остаток дезоксирибозы находится в С2'-эндо-конформации, то при переходе в А-форму он принимает С3'-эндо-конформацию. Различия конформаций сахарного кольца приводят к неодинаковым геометрическим характеристикам двойных спиралей: разному смещению пар относительно оси спирали, углу наклона пар и размерам минорного и главного желобков. В А-форме ДНК на виток спирали приходится 11 пар оснований. Период спирали в спиртовых растворах близок к этой величине. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 2,56 Å. Пары оснований в А-ДНК, так же как и в В-ДНК, почти плоские, но они наклонены на $\sim 20^\circ$ к плоскости, перпендикулярной оси спирали [9]. В А-форме ДНК диаметр спирали увеличивается по сравнению с В-формой, изменяется также ширина и глубина бороздок, основания в А-форме не перпендикулярны

оси спирали, а большой желобок более узок и глубок. Перекрытие оснований в А- форме ДНК больше, чем в В-форме. Отметим, что А- и В-формы ДНК могут переходить одна в другую при изменении внешних условий среды [10, 11].

При понижении влажности или активности воды в растворе (например, при добавлении спирта), спираль ДНК может принимать формы, отличные от уотсон-криковской В-формы, и переходить в А-форму. Этот переход связан в первую очередь с изменением конформации углеводного остатка с С2'-эндо на С3'-эндо. Это приводит к уменьшению расстояния между фосфатными группами и, следовательно, к уменьшению расстояний между нуклеотидными парами вдоль оси спирали до примерно 0,25 нм.

ДНК может перейти в А-форму также при связывании с некоторыми препаратами или белками [12,13]. Изучение методом молекулярной динамики связывания препаратов ДНК установило, что для всех лигандов при их комплексообразовании с малым желобком ДНК происходит высвобождение части связанной воды как со свободной ДНК, так и с комплекса в целом. Препараты, связывающиеся с двуспиральной ДНК в малом желобке, имеют широкое применение в клинической практике для химиотерапии раковых заболеваний [14,15]. Эффективность медико-биологического действия таких соединений во многом определяется узнаванием лигандом рецептора – участка молекулы нуклеиновой кислоты. Важную роль в таком узнавании играет гидратная оболочка малого желобка ДНК, состоящая из цепочки высокоупорядоченных молекул воды с большими временами оседлой жизни (t) - «хребет гидратации». Разрушение этой упорядоченной системы молекулой лиганда при комплексообразовании является энтропийно выгодным. В то же время, значение t гидратной оболочки самого лиганда может возрасти на порядок при его связывании с ДНК по сравнению со свободным состоянием, что энтропийно невыгодно. Считается, что молекулы воды, непосредственно взаимодействующие с ДНК играют ключевую роль в стабилизации комплексов

таких лигандов с нуклеиновыми кислотами, в частности, за счет образования водных мостиков между лигандом и ДНК. Кроме этого, гидратное окружение ДНК содержит и слабо связанную воду, непосредственно не взаимодействующую с ДНК и характеризуемую малыми временами оседлой жизни t [16, 17].

Помимо классических правозакрученных форм, ДНК может принимать и конформацию левой спирали *Z-формы*.

Z-форма, левозакрученная двойная спираль, геометрия которой определяется чередованием *син*- и *анти*-конформаций нуклеотидов в отличие А и В-спиралей, где все нуклеотиды находятся в *анти*-конформациях. Левозакрученная Z-ДНК легко возникает в последовательностях с чередующимися пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. В левых конформациях отсутствует ось 2-го порядка, проходящая через пару. Надо отметить, что для осуществления В→Z-перехода не требуется расхождения цепей. Переход инициируется разрывом нескольких пар оснований, после чего гуанин «закрепляется» в *син*-конформации, а цитидин поворачивается так, что *анти*-конформация сохраняется. Затем водородные связи восстанавливаются, и основания вновь образуют уотсон-криковские пары. Z-ДНК тоньше (18Å), чем В-ДНК (20 Å), азотистые основания сдвинуты к периферии спирали, и существует только одна глубокая, узкая бороздка эквивалентная малой бороздке В-ДНК. В→Z-переход в ДНК зависит от нуклеотидной последовательности и происходит преимущественно на участках с последовательностью d(GpC) [18,19].

Следует отметить, что структурные переходы из В-конформации ДНК в другие формы не зависят от температуры и могут быть вызваны изменением условий окружающей среды.

На рисунке 2 приведены три (В, Z и А) структурные формы ДНК.

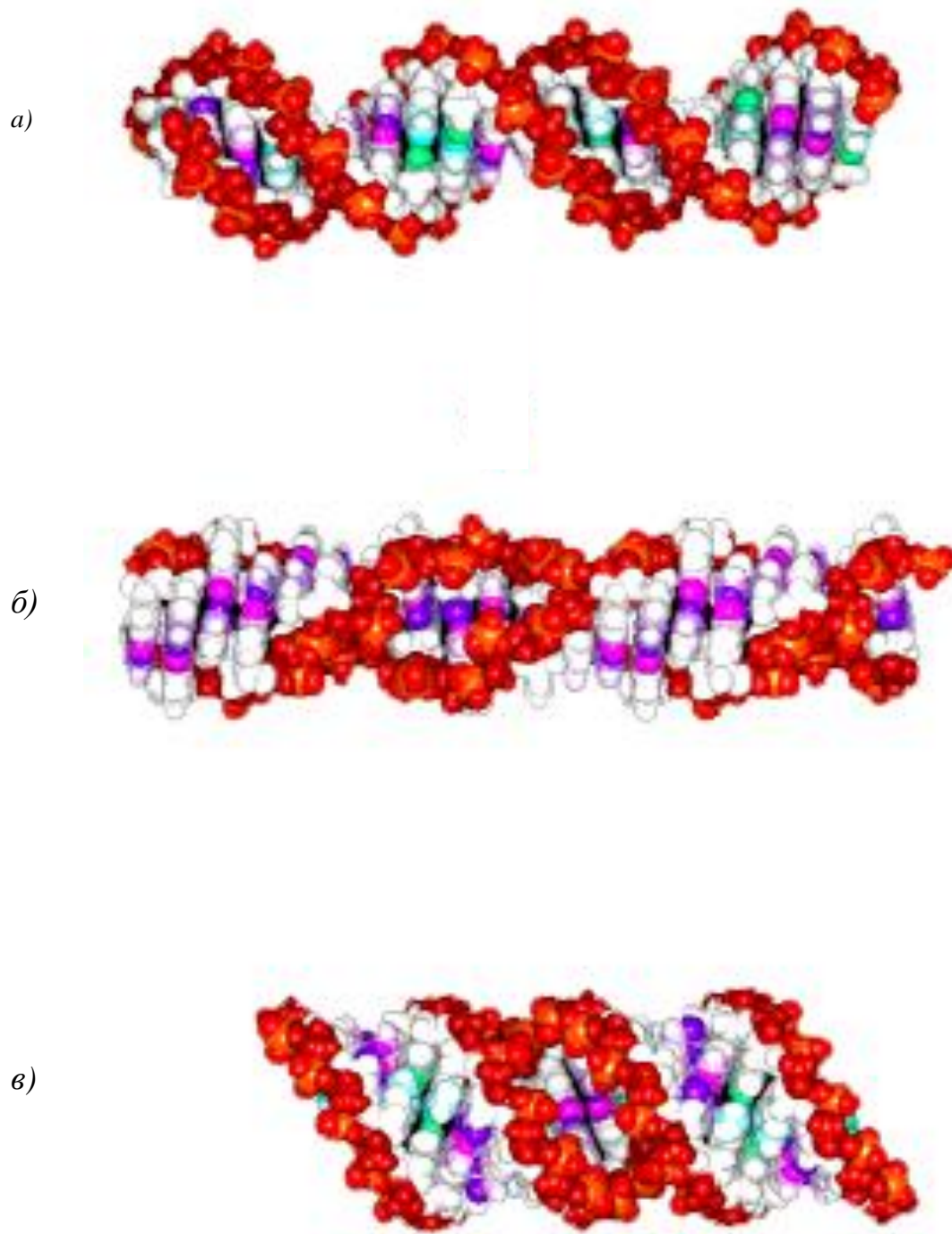


Рис.2. Формы ДНК. а) В-форма ДНК, б) Z-форма ДНК, в) А-форма ДНК
[http://virtuallaboratory.colorado.edu/Biofundamentals-web/lectureNotes-Revision/Topic3-2_NucleicAcids.htm]

1.1.2 Гидратация и конформация ДНК

Вода – самая аномальная и наименее понятная жидкость по своим макроскопическим свойствам, но с другой стороны, благодаря тем же самым свойствам, это – единственная известная среда для поддержания жизни. Однако вода является не просто средой, которая растворяет вещество. Взаимодействия между растворимым веществом и водой играют важную роль в определении предпочтительной конформации и связывающих свойств нуклеиновых кислот. Хорошо известно, что стабилизация структуры двойной спирали ДНК происходит в основном за счет трех факторов: (1) водородные связи между комплементарными парами оснований, (2) вертикальные π -электронные стэкинг взаимодействия между основаниями, и (3) электростатические силы между фосфатными группами (PO_2) и сольватированными катионами (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , и т.д.). Другим незаменимым вкладом в стабилизацию структуры ДНК является гидратация. Об этом свидетельствуют различные картины рентгеновской дифракции на волокнах натриевой соли ДНК (Na^+ -ДНК) в зависимости от относительной влажности окружающей среды. Эти волокна дают четкую стандартную картину рентгеновской дифракции В-ДНК, только когда слой находится в среде с 92% относительной влажностью. Когда влажность падает ниже 75%, рентгеновская дифракционная картина значительно изменяется, что свидетельствует об изменении конформации волокон ДНК в сторону А-формы. Когда влажность падает ниже 60%, то становится трудно получить четкую картину рентгеновской дифракции, и предполагается, что в этом случае ДНК не имеет четко определенной структуры [9].

Макромолекула ДНК представляет собой полиэлектролит, сильно и неравномерно гидратированный. Аминогруппы нуклеиновых оснований являются хорошими акцепторами протонов и при установлении водородной связи в кислой области приобретают положительный заряд. Фосфатные группы в физиологических условиях всегда отрицательно заряжены. Таким образом

гидратация нуклеиновой кислоты играет важную роль в организации конформации ДНК (А, В и С конформации) и в структуре растворителя вблизи поверхности макромолекулы, особенно со стороны ее большого желобка. В соответствии со своей амфолитной природой ДНК взаимодействует с ионами электролитов, так что при увеличении ионной силы раствора наблюдаются изменения как молекулярного объема и степени гидратации ДНК, так и спирализации ее цепей [20].

Сфера гидратации, (или гидратная оболочка) определяется как слой, состоящий из всех термодинамически измененных молекул воды около растворимого вещества. С термодинамической точки зрения, гидратация может рассматриваться как связывание молекул воды с гидратируемыми участками растворенного вещества. Гидратированная вода химически идентична с обычной свободной водой. Различия между этими двумя типами воды только в их физических свойствах [21].

Эффект изменения гидратации может иметь как структурные, так и термодинамические компоненты. Структурный эффект определяется свойствами упорядоченных молекул воды, которые служат локальными донорами или акцепторами водородных связей для полярных и заряженных групп макромолекулы или макромолекулярного комплекса. Часто, эти связанные молекулы воды служат для соединения полярных и заряженных групп биополимеров и их комплексов и могут восприниматься как структурное продолжение макромолекулы. Термодинамический вклад гидратации определяется вызванными растворимым веществом изменениями в энергетике всех связанных молекул воды. В этом контексте, структурированные молекулы воды представляют только долю общего количества термодинамически измененных молекул воды [22]. Во всех формах ДНК наиболее предпочтительным местом связывания молекул воды являются О1Р и О2Р кислороды фосфатных групп (рис. 3). Каждый из двух частично заряженных кислородов фосфатных групп, О1Р и О2Р, имеет три участка гидратации в первом гидратном слое, которые формируют так называемый "конус гидратации."

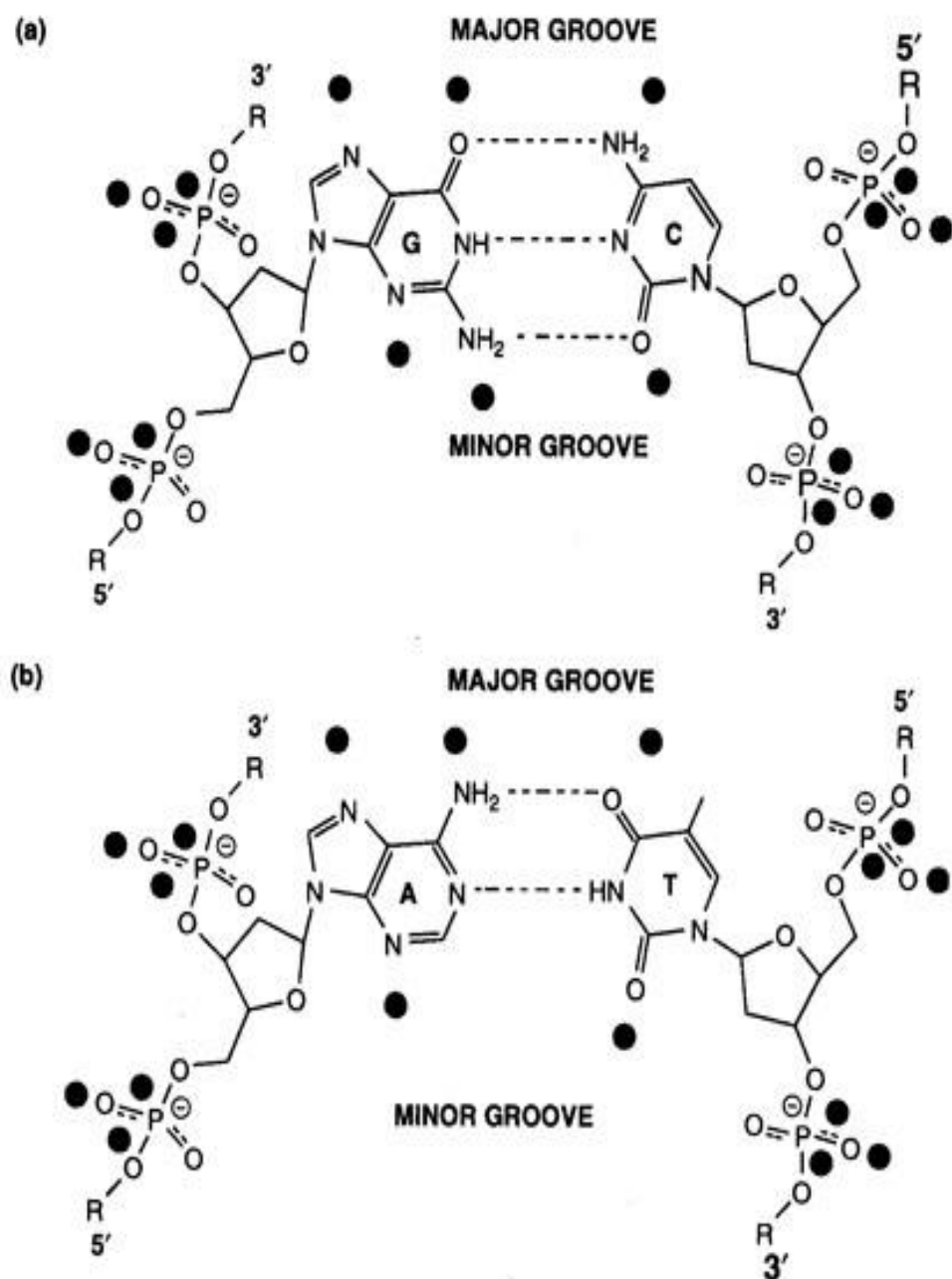


Рис.3 Химическая структура GC- и AT-пар оснований со схематическим представлением потенциальных участков гидратации. Схема определяет те функциональные группы ДНК, около которых молекулы воды, согласно рентгеноструктурным данным, наблюдаются наиболее часто. [25]

Следующим сильным местом связывания являются гидрофильные оксигруппы пуриновых и пиримидиновых оснований, и экзоциллические и эндоциллические атомы азота оснований [23]. O3' и O5' кислорода фосфодиэфиров и O4'кислород сахара гидратируются плохо. У O3' и O5' кислорода на расстоянии ближе чем 3Å, связанных молекул воды не существует.

Для правоспиральных А- и В - ДНК, атом O5' стерически недоступен для воды. Все водные контакты с O3' длиннее 3.1 Å, что предполагает только слабую водородную связь между молекулами воды, предварительно связанными с частично заряженными кислородами O1P и O2P. O4' атом кислорода фуранозного кольца, который обычно закрыт присоединенным к нему основанием или в результате стекинга с соседним основанием, может участвовать в гидратационной сетке, хотя его вовлечение зависит от доступности этого места для молекул воды. В А- и В-ДНК, обычно O4' атом связывается через молекулы воды в малом желобке с гидрофильными атомами оснований предыдущего остатка.

Периодичность двуспиральных нуклеиновых кислот облегчает возможность молекул воды образовывать регулярные гидратационные сетки внутри и около бороздок. Исследования монокристаллов олигомеров ДНК методом рентгеновской дифракции высокого разрешения показали, что в минорном желобке АТ - богатых областей В - ДНК находятся высокоупорядоченные молекулы воды, соединяющие O2 - атомы тимина с N3 - атомами аденина [24]. Эти два атома, связанные водным мостиком, принадлежат соседним парам оснований, а мостик соединяет основания, относящиеся к разным олигонуклеотидным цепям (рис.4). К этому первому гидратному слою примыкает второй, который заполняет тетраэдрические связи молекул первого слоя и образует вместе с ними характерный водный «хребет» в минорном желобке спирали.

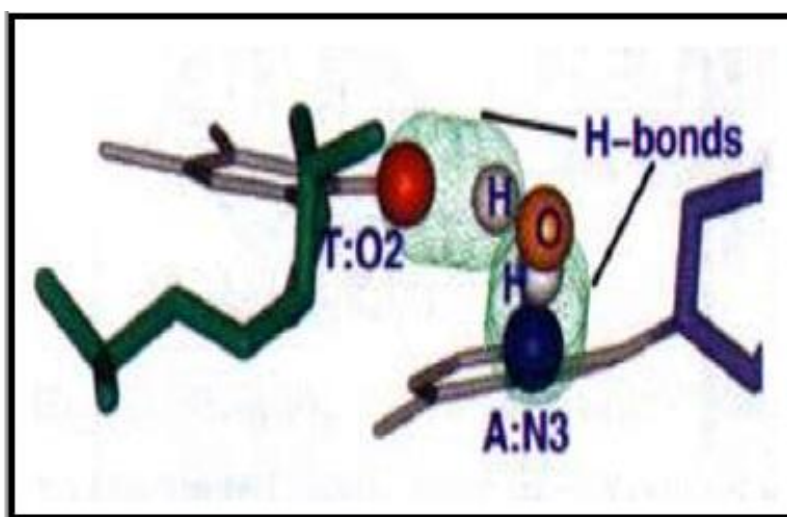
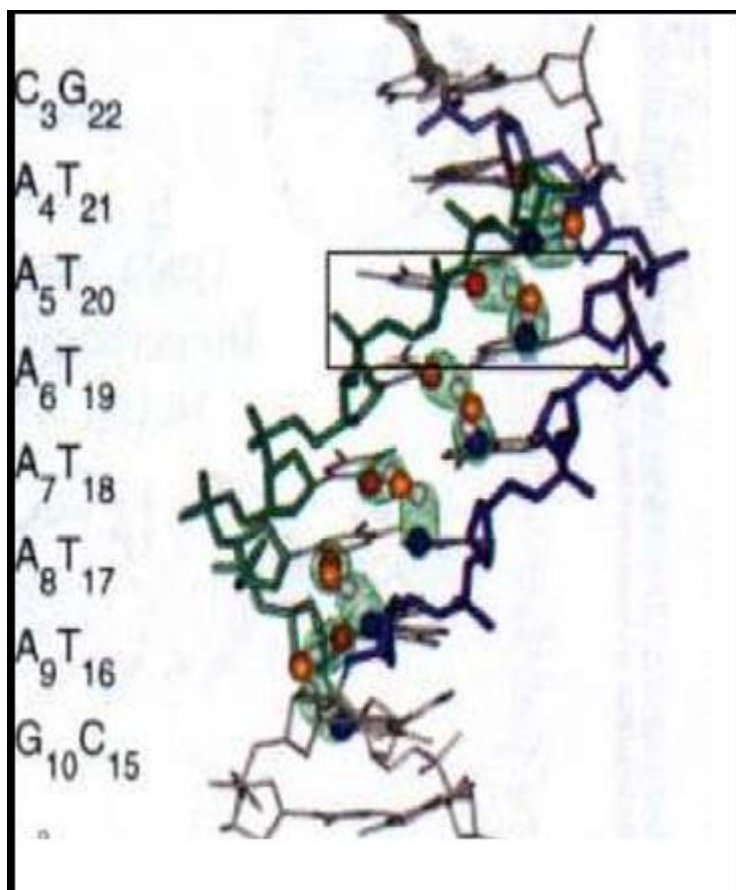


Рис. 4. Хребет молекул воды в малой бороздке В-ДНК[22].

Молекулы воды третьего и четвертого слоев видны не так отчетливо; по-видимому, они образуют водородные связи с фосфатными группами, окаймляющими края минорного желобка. На участках CGCG, замыкающих центральную последовательность AATT, подобной упорядоченной водной структуры не обнаружено, вероятно, из-за того, что присутствующие здесь объемные N²-аминогруппы, являющиеся донорами при образовании водородных связей, мешают формированию регулярного гидратного «хребта». В большинстве случаев, связывающиеся в бороздках молекулы лиганды, такие как нетропсин, заменяют хребет из молекул воды, тем самым стабилизируя как структуру дуплекса, так и ДНК- лиганд комплекс.

Анализ кристаллической структуры иодированного тетрамера d('CCGG) показал, что характер гидратации А - и В - форм ДНК существенно различаются. У А-ДНК ни в одном из желобков нет гидратного «хребта» и отсутствует явно выраженная первичная гидратная оболочка сахаров и оснований. Фосфатные группы, однако, гидратированы, причем, в отличие от В-ДНК, гидратный слой А-ДНК высокоупорядочен. В А-ДНК через главный желобок тянутся нити из молекул воды, которые сшивают фосфатные группы друг с другом.

При высокой концентрации спирта (условие образования А-формы ДНК) с атомами кислорода фосфатных групп ДНК связываются дополнительно от 1 до 5 молекул воды, из которых почти 40% образуют мостики между двумя или большим числом атомов кислорода фосфатов. Такой тип гидратации осуществляется в главном желобке; кроме того, там же наблюдается монодентатное связывание молекул воды с атомами кислорода кето-групп и с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых оснований. Вдоль каждой цепи тянутся мостики, состоящие из 1 -3 молекул воды, которые связывают друг с другом соседние фосфатные группы.

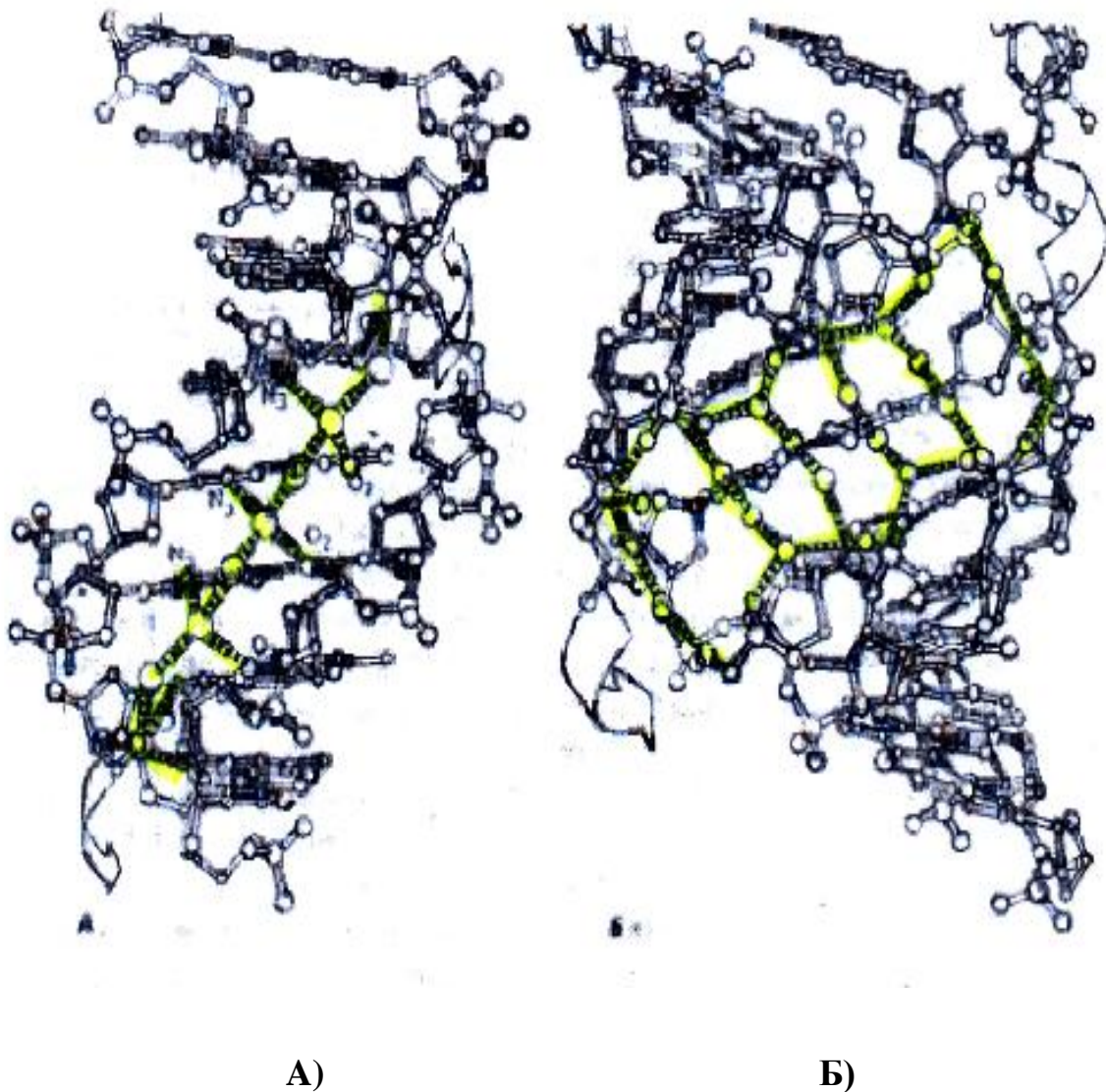


Рис. 5. *А.* Расположение молекул воды в минорном желобке на участке ААТТ додекамера В-ДНК. Первый гидратный слой образует водородные связи с атомами O2 пиримидинов и N3 пуринов, второй слой заполняет тетраэдрические координатные оболочки молекул воды первого слоя. *Б.* В А-форме ДНК через главный желобок тянутся “нити” из молекул воды, которые “сшивают” фосфатные группы друг с другом [2].

Кроме того, имеются цепочки из четырех молекул воды (схематически изображены на рис.5), которые пересекают главный желобок и соединяют ОЗ-атомы одной олигонуклеотидной цепи с ОР2-атомами другой; при этом появляется ось симметрии 2-го порядка, связывающая две водные цепи, отходящие от одной фосфатной группы.

Систематически расположенные цепочки молекул воды, соединяющие противоположные фосфатные группы, «сшивают» края главного желобка и тем самым стабилизируют А-форму двойной спирали ДНК (или РНК). Существование таких водных мостиков между фосфатными группами было предсказано ранее на основании теоретических расчетов [2].

Экспериментально обнаружено, что гидратная оболочка двойной спирали ДНК, зависящая в первую очередь от GC-содержания и чередования оснований, может играть важную роль при переходах ДНК из основной В-конформации в другие упорядоченные формы. Частично это обстоятельство нашло подтверждение установлением взаимосвязи между гидратацией, GC-содержанием и способностью ДНК принимать различные упорядоченные формы. Структурные особенности гидратной оболочки ДНК чрезвычайно важны для понимания проблем организации, устойчивости и функционирования ДНК [25].

После того, как экспериментально было определено расположение молекул воды в гидратных оболочках, стало понятно, почему при изменении активности воды происходят А-В-переходы. В условиях, когда активность воды высока (при низкой концентрации соли), монослоем молекул воды (и слоями более высокого порядка) окружены все функциональные группы фосфатов, оснований и сахаров, что способствует сохранению структуры В-формы. Если полинуклеотид содержит протяженные участки, состоящие из АТ-пар, то в минорном желобке образуется водный хребет; который еще сильнее стабилизирует данную конформацию. Поэтому в случае poly(dA)poly(dT) переход В-А не происходит, а для poly(dA-dT)-poly(dA-dT) А-форма является

лишь метастабильным состоянием. Можно вспомнить также, что полинуклеотиды, у которых гуанозины замещены на инозины (т.е. у которых отсутствуют N2-аминогруппы, мешающие образованию водного хребта), ведут себя подобно полимерам, состоящим из АТ-пар. т.е. также образуют только двойные спирали В-семейства. При уменьшении активности воды (при добавлении спирта) гидратные оболочки оснований и сахаров разрушаются, остаются гидратированными лишь наиболее полярные группы - атомы кислорода фосфатных групп. Такое изменение гидратации индуцирует В - А-переход, при этом А-форму стабилизируют цепочки молекул воды, связывающие атомы кислорода противоположных фосфатов и «стягивающие» края главного желобка. Если снова увеличить активность воды, двойная спираль ДНК станет более гидратированной и произойдет обратный переход А – В [26].

1.1.3. Ионная сила и конформация ДНК

Как уже было сказано выше, молекула ДНК представляет собой полиэлектролит, несущий достаточно сильный отрицательный заряд на кислородах фосфатных групп. Для образования двуспиральной структуры необходима нейтрализация этого заряда положительными ионами. Эту роль обычно выполняют одновалентные катионы металлов (Na^+ или K^+). Известно также, что одновалентные ионы связываются с ДНК не локально (с отрицательно заряженными кислородами фосфатных групп), а образуют на ДНК ионную “шубу”, окружая всю ДНК, включая бороздки. Ионная сила является характеристикой для электролитного раствора и считается по формуле, $I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2$ где C_i - молярные концентрации отдельных ионов, z_i - заряды ионов. Установлено, что для образования двуспиральной структуры ДНК необходимо ее растворять в буфере, содержащем как минимум 10^{-3}M одновалентных ионов [27].

Как видно из приведенной формулы ионная сила буфера создается всеми растворенными в воде ионами, и если в качестве анионов в клетке выступают как правило ионы хлора, то катионами могут служить не только одновалентные, но и многовалентные ионы металлов. Хорошо известно, что ни один жизненно важный функциональный процесс в клетке не происходит без участия того или иного конкретного иона металла [28,29]. В частности, ионы двухвалентных металлов относятся к очень важной группе биологически активных веществ, играющих значительную роль в функционировании нуклеиновых кислот.

Ионы двухвалентных металлов, в отличие от одновалентных катионов, связываются с ДНК локально (не в виде шубы). Например, ионы щелочноземельных металлов связываются только с фосфатными группами ДНК образуя хелаты с соседними фосфатными группами. А двухвалентные ионы переходных металлов, к которым относятся исследованные нами ионы Mn^{2+} , могут реализовать несколько типов связывания. Вследствие специфики их электронной структуры они, помимо взаимодействия с фосфатными группами, могут взаимодействовать также и с основаниями, а также с обоими сразу посредством образования хелатных комплексов. Все эти способы связывания могут реализоваться в зависимости от условий среды (концентрации ионов, температуры, ионной силы раствора, рН, полярности растворителя, последовательности и содержания нуклеотидных пар в ДНК).

При нейтральных рН и низких ионных силах ($10^{-3}M Na^+$), когда активность воды высока, ДНК находится в В конформации, однако при столь низкой концентрации ионов Na^+ биспиральная ДНК обладает достаточно лабильной конформацией, чувствительной к изменению параметров раствора. Добавление ионов Mn^{2+} к такому раствору приводит к увеличению степени спиральности ДНК скорее всего вследствие дополнительной экранировки отрицательно заряженных фосфатных групп ионами металла [30,31].

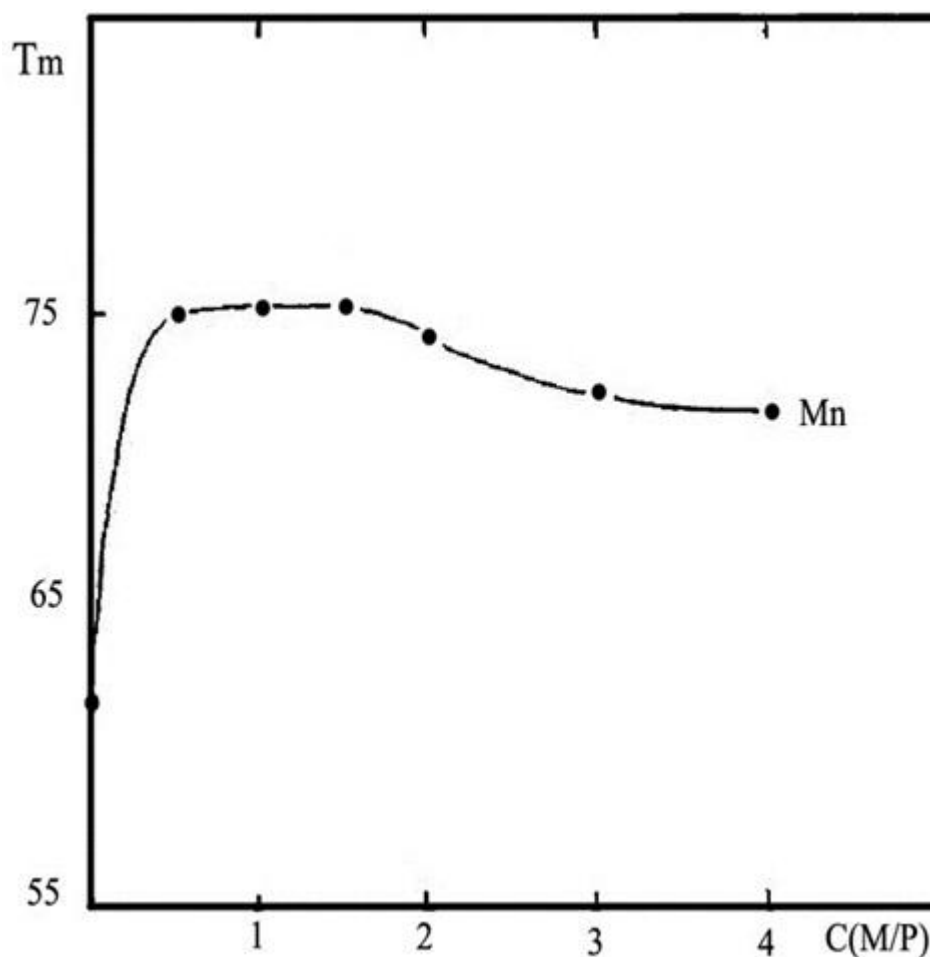


Рис. 6. Зависимость температуры плавления ДНК от концентрации добавляемого иона Mn^{2+} при низких ионных силах ($10^{-3}M Na^+$) [32].

Естественно, что стабилизация структуры ДНК должна привести не только к росту гипохромности, но и к увеличению ее термостабильности. Как видно из рис.6 термостабильность ДНК резко возрастает при добавлении в раствор 0.5 М/Р ионов Mn^{2+} и до концентраций 2 М/Р температура плавления не изменяется. Это означает, что при малых концентрациях (1 ион на 2 фосфатные группы) ионы Mn^{2+} эффективно экранируют фосфатные группы спиральной ДНК, выступая в качестве противоионов. Уменьшение же термостабильности при более высоких концентрациях ионов связано с взаимодействием этих ионов с основаниями ДНК, приводящими, к локальному разупорядочению спиральной структуры в местах связывания [32].

В этой работе мы будем использовать ионы Mn^{2+} только в качестве противоионов для экранировки фосфатных групп ДНК при низкой ионной силе буфера ($10^{-3}M Na^+$). Увеличение ионной силы раствора посредством добавления двухвалентных ионов Mn^{2+} имеет две цели: 1) при концентрации 1 ион на 2 фосфатные группы заряд фосфатных групп двойной спирали ДНК полностью экранируется, 2) бороздки спирали ДНК остаются свободными. Оба эти фактора важны для исследования механизмов взаимодействия порфиринов с ДНК. Отрицательный заряд фосфатных групп является основным фактором притягивания к ДНК катионических порфиринов из раствора. Как будет сказано в следующем параграфе, катионические порфирины могут взаимодействовать с ДНК несколькими механизмами, один из которых - внешнее связывание в желобках ДНК с участием фосфатных групп. При полной экранировке фосфатных групп мы специфически блокируем внешний механизм связывания и можем исследовать остальные типы связывания порфиринов с ДНК.

1.2 Структура порфиринов и металлопорфиринов

Порфирины используются в природе в наиболее важных процессах фотосинтеза и для решения транспортных и других проблем в живых системах. Эти соединения были описаны как «молекулы жизни», особое место принадлежит комплексным соединениям порфиринов -металлопорфинам.

Основой всех этих соединений является простейший макроцикл – порфин, который состоит из 16-членного цикла с 4 атомами азота, образованного замыканием четырех пиррольных колец с помощью метиновых ($-CH=$) мостиков (рис.7).

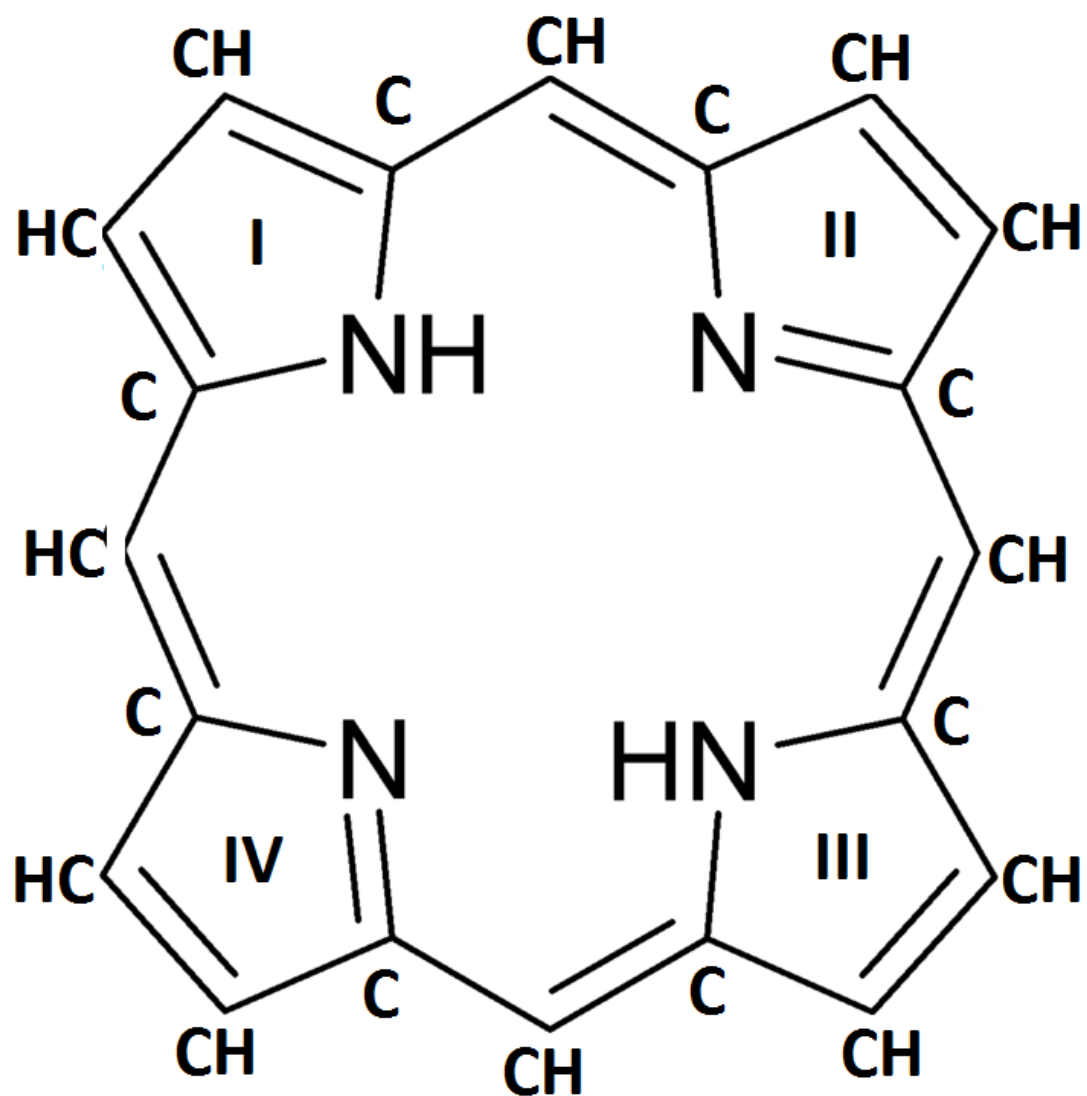


Рис.7. Структура порфина
[<https://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin>]

Подробную информацию об особенностях молекулярной структуры порфиринов дают электронные спектры поглощения и испускания, а также ИК - и ЯМР – спектры [35]. На электронных спектрах поглощения свободного порфирина имеется 4 полосы поглощения сравнительно невысокой интенсивности в видимой области называемая “Q-полоса”, и одна полоса, очень высокой интенсивности (молярный коэффициент поглощения $\epsilon > 10^5$) называемая “Соре полоса” (рис.8).

Полосы поглощения I и III характерны для чисто электронных переходов, а полосы II и IV, как показано в работе, относятся к электронно-колебательным переходам. Эти переходы относятся к квазизапрещенным $\pi - \pi^*$ - переходам. У всех незамещенных порфиринов полосы I – IV имеют относительно низкую интенсивность. Высокоинтенсивная полоса - полоса Соре, отвечает разрешенному чисто электронному переходу [36].

Дополнительную информацию о структуре молекул порфиринов и их комплексов дают ИК - спектры, на которые особенно сильно влияют состояния N–N групп и координационного центра металл –N₄. Всякое изменение структуры молекулы порфирина, приводящее к изменению σ - и π - электронной плотности макрокольца, отражается на состоянии связей N–N и N–металл и может быть зафиксировано изменением частоты их колебания. Одним из важнейших свойств порфина и его производных является наличие в молекуле координационной полости, ограниченной атомами азота, которые способны чрезвычайно прочно координировать ионы металлов M²⁺, M³⁺, M⁴⁺ и даже с большей степенью окисления. В результате комплексообразования или координации образуются комплексные соединения порфиринов - металлопорфирины, обладающие многообразными структурными и химическими особенностями, высокой биологической и каталитической активностью. При этом металл либо занимает центр полости N₄ и оказывается в плоскости ху, либо оказывается приподнятым над плоскостью, в которой лежат атомы N₄, и образует координационные узлы (L)_nMN₄ различной геометрической структуры

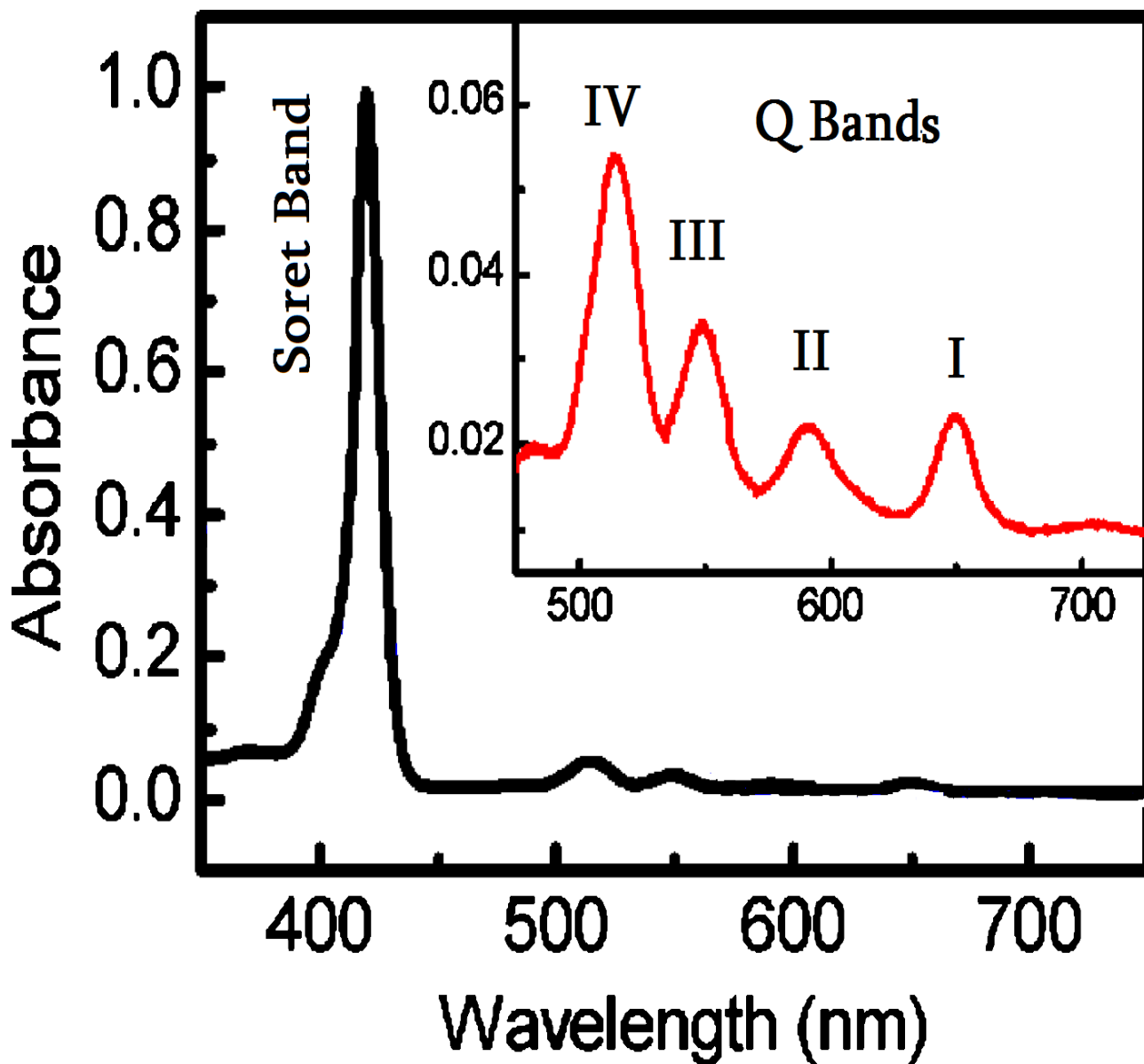


Рис.8. Электронный спектр поглощения порфирина.

[<http://nanolithography.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1099708>]

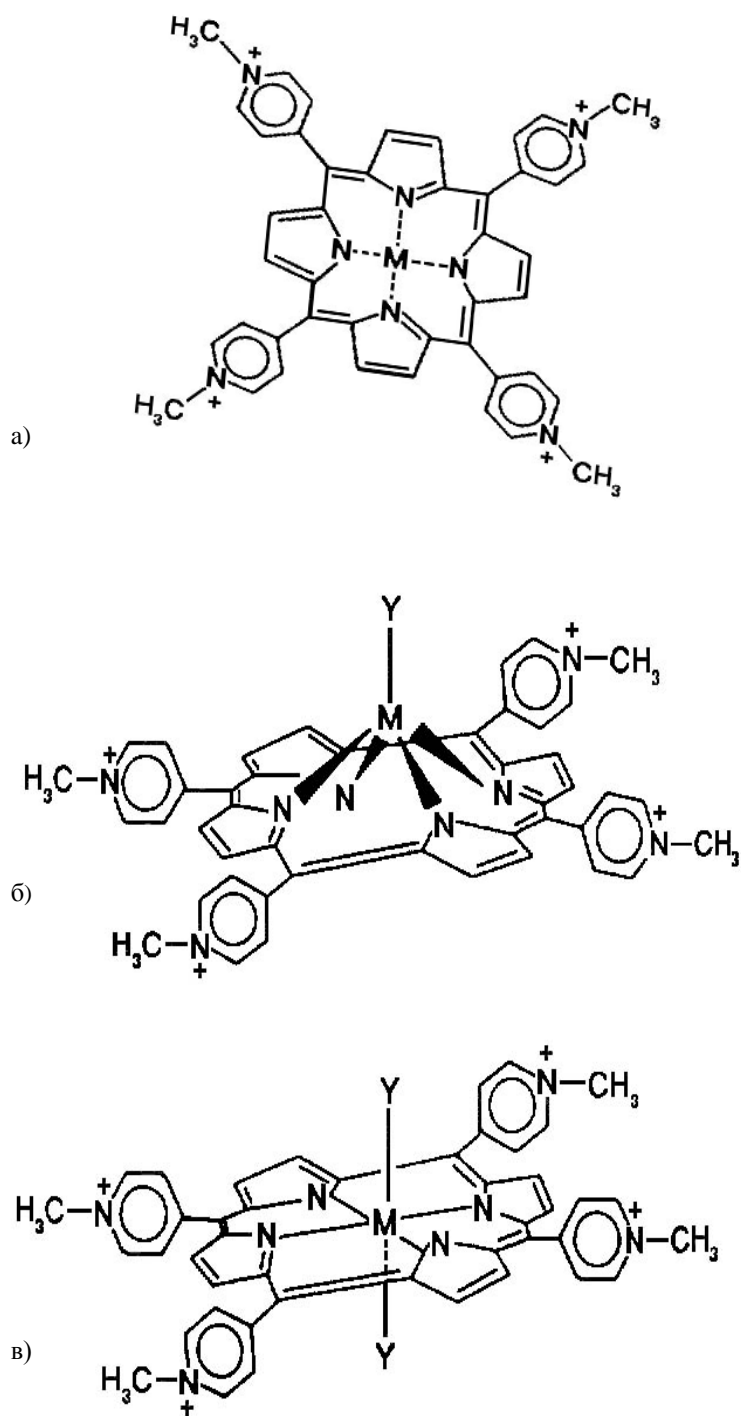


Рис. 9. Пространственная структура металлокомплексов мезо-тетра(4N-метил-пиридил)порфирина с металлами с разными координационными числами. (а) $Me = Cu(II)$, (б) $Me = Zn(II), Co(II)$, (в) $Me = Mn(III), Ni(II)$ [37].

Это произойдет, если к комплексу в растворе инертного растворителя прибавить лиганд (L) – сильно координирующую (электродонорную) молекулу. Тогда лиганд L, вступая в донорно-акцепторную связь с металлом M, «вытянет» его из плоскости N_4 рис.9(б). Если металл M окажется в состоянии присоединить вторую молекулу L той же природы с противоположной стороны плоскости xy , тогда металл возвращается в центр полости N_4 рис.9(в) [37].

Лиганды (L), способные вступать в координационную сферу металла, уже занятую четырьмя атомами азота порфирина, называются аксиальными лигандами. Образующиеся комплексы называют экстракомплексами. Экстракоординация является важнейшим свойством металлопорфиринов, т.к. обеспечивает их достаточную химическую связь с окружающей средой. На рисунке 9 показана координация металлов для плоского порфирина без аксиального лиганда Cu(II) и Ni(II) рис.9(а), с одним аксиальным лигандом Zn(II), Co(II), Fe(III) рис.9(б) и двумя аксиальными лигандами Mn(III), Fe(III), Ni(II) и Co(III) рис.9(в) [38,39].

Высокая прочность $C=N=$ и $C=C-$ связей и сильные σ -электронные перекрывания по всему контуру макроцикла придают последнему относительную жесткость к деформациям, электронное и ядерное экранирование координационной полости N_4 , планарность. Это – главные особенности молекулярной структуры порфиринов. Геометрическая структура порфиринового лиганда является важным элементом структуры, влияющим на физико-химические и биологические свойства металлопорфиринов [40, 41].

1.3 Взаимодействие порфиринов и металлопорфиринов с ДНК

Благодаря своим уникальным свойствам порфирины, проникая в клетку могут взаимодействовать с биологическими макромолекулами клетки, в частности, с ДНК и РНК. Несмотря на то, что иногда медико-биологические свойства порфиринов удается определить, однако механизм их взаимодействия

с нуклеиновыми кислотами практически в каждом конкретном случае требует индивидуального изучения.

Катионные порфирины очень универсальны в зависимости от числа положительных зарядов, а также типов заместителей, и от вида ионов металла, координированного в центре порфирина [42]. Следовательно, они проявляют различные закономерности взаимодействия при связывании с ДНК, в зависимости от следующих факторов:

1. Положение и число положительных зарядов.
2. Тип и положение заместителей порфиринового кольца.
3. Последовательность оснований ДНК, отсутствие или присутствие иона металла и его тип в порфирине, также имеют важное влияние на связывание с ДНК [43,44].

Взаимодействие порфиринов с ДНК достаточно хорошо изучено. Весьма детально было исследовано взаимодействие водорастворимых катионических мезо - тетра (4 - N - метилпиридил) порфиринов (TMPyP4) с ДНК [45-48].

На основе многочисленных исследований установлено, что порфирины могут взаимодействовать с ДНК тремя основными механизмами [49, 50]:

Оба типа внешнего связывания порфирина с ДНК происходят путем электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными фосфатными группами [51-54]. Рисунок 10 иллюстрирует механизмы связывания ДНК.

Интеркаляция. Наличие интеркаляционного механизма связывания порфиринов с ДНК впервые было показано Филом с соавторами при изучении взаимодействия мезо – тетра - (4N - пиридил) порфирина (TMPyP) с ДНК [55]. Обычно, интеркалирующие молекулы имеют плоские гетероароматические кольцевые системы, которые могут быть вставлены между двумя соседними парами оснований в спираль.

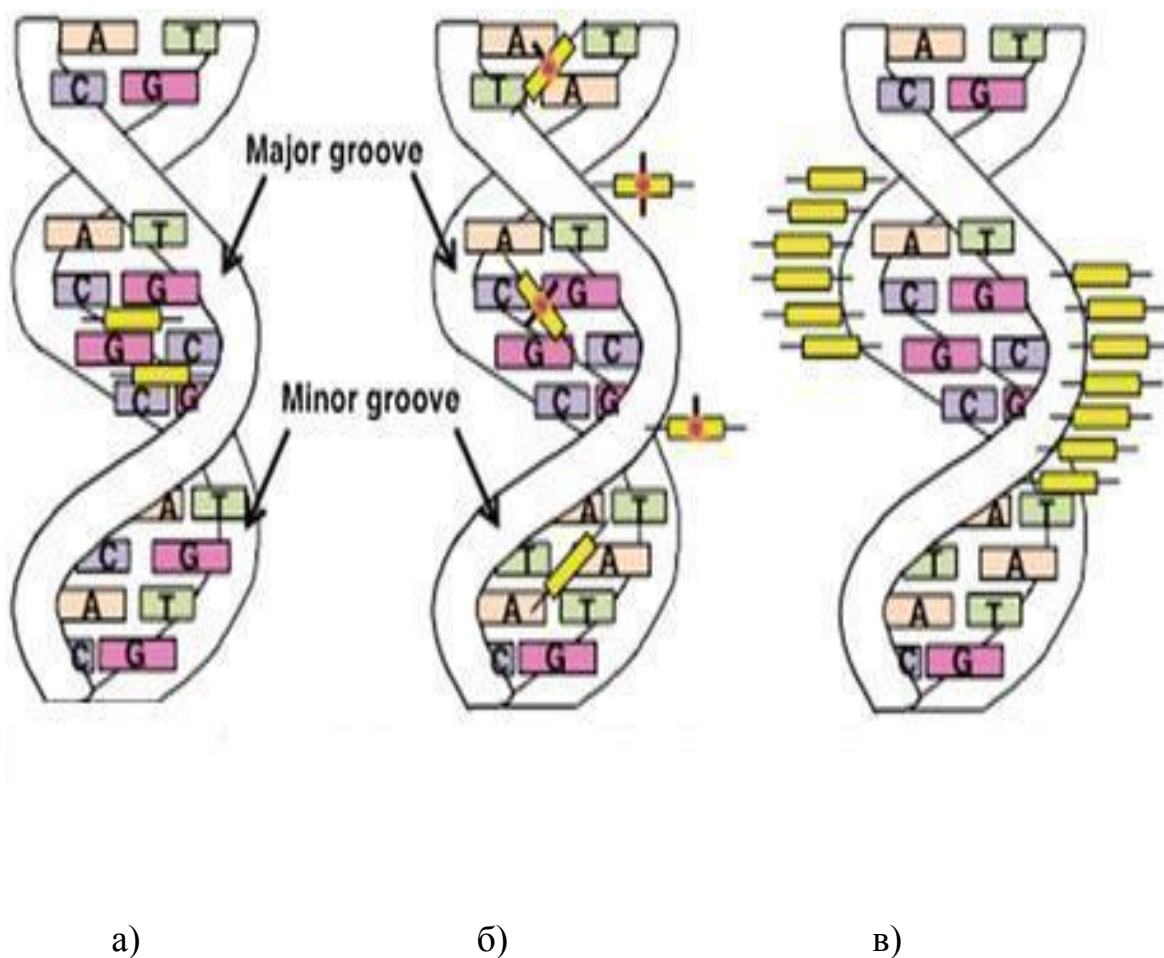


Рис. 10. Схематическая диаграмма, иллюстрирующая механизмы связывания комплексов ДНК с ТМРyP4. а) интеркаляция, б) внешнее неупорядоченное желобковое связывание, в) внешнее упорядоченное связывание.

[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F7081_2013_113]

Интеркалирование связанной молекулы в спираль ДНК становится возможным благодаря расширению и локальному раскручиванию спирали. Расстояние между парами оснований увеличивается от 3.4 \AA до $\sim 6.8 \text{ \AA}$, чтобы получить достаточное пространство для внедрения интеркалятора. Интеркалированная молекула располагается таким образом, чтобы ее N-кольцо находилось в центре спирали ДНК между выше или ниже расположенными водородными связями оснований так, чтобы обеспечить максимальное взаимодействие между их π -электронными системами. Полученный комплекс стабилизируется гидрофобными взаимодействиями между парами оснований и плоскостью интеркалированной молекулы. Об этих структурных изменениях также свидетельствуют увеличение вязкости раствора ДНК, уменьшение коэффициента седиментации и удлинение молекулы ДНК. Полученные экспериментальные данные по измерению удлинения молекул ДНК в случае интеркалирования порфирина показывают, что из всех потенциальных мест занято только 44%. То есть, судя по этому результату можно сказать, что интеркаляция в каждое второе место (между парами оснований) невозможна из-за нарушения геометрии нуклеотидов, примыкающих к интеркалятору (в данном случае порфируну) [56].

Структурные изменения, которые происходят при интеркаляции могут быть использованы в качестве надежного диагностического теста для выявления механизма связывания.

В некоторых работах, методом рентгеноструктурного анализа рассматривается также возможность связывания порфиринов частичной интеркаляции, так называемой полуинтеркаляции. Согласно полученным данным молекула порфирина “частично” интеркалирует в GC- участки, при которой наблюдается удлинение дуплекса, а в участках связывания происходит раскручивание спирали в целом на 35° градусов [57].

Внешнее взаимодействие. Энергетически более слабое внешнее связывание происходит благодаря электростатическому притяжению молекул лигандов к внешней части ДНК. Существует два типа внешнего связывания для лигандов порфиринового типа: 1) *внешнее неупорядоченное взаимодействие*, и 2) *внешнее упорядоченное взаимодействие*.

Внешнее неупорядоченное взаимодействие. Как правило, этот механизм взаимодействия имеет место при связывании непланарных порфиринов, имеющих аксиальные лиганды [58]. Для этого механизма связывания характерно размещение молекул порфирина в большом желобке ДНК так, что плоскость порфиринового кольца оказывается практически параллельной оси спирали ДНК. Этот способ связывания называется также “face-on” –тип связывания (рис.10.б).

При комплексообразовании с определенными порфиринами, комплексы стабилизируются также взаимодействием между центральным металлом порфирина и С=О группой тимина. В частности, для порфирина CuTPyP4 в работе [59,60] показано, что для реализации “face-on” связывания с ДНК необходимо наличие четырех последовательных АТ- пар. В местах связывания наблюдается уширение большого желобка, однако водородные связи спаривания пар оснований сохраняются.

Внешнее упорядоченное взаимодействие. Внешнее упорядоченное связывание происходит по принципу кооперативности: связывание одной молекулы лиганда способствует связыванию следующей молекулы. Это обусловлено тенденцией к стэкинг-взаимодействию между связанными молекулами, особенно в области тех концентраций, при которых происходит самоагрегация молекул в растворе. В отличие интеркаляции, связывание в малой бороздке обычно не вызывает каких-либо существенных структурных изменений в ДНК. В некоторых случаях, благодаря возможности дополнительного стэкинг-взаимодействия, сродство мест связывания к подобным молекулам на поверхности ДНК становится столь большим, что они

могут эффективно конкурировать с местами интеркалирования. Отметим, что интеркаляция происходит в основном в GC-богатых участках (5'-CG-3'), а внешнее связывание в AT-богатых участках (5'-AT-3') [61,62].

Серия работ Пастернака и соавторов позволила определить кинетические и спектроскопические характеристики вышеназванных моделей связывания [50, 53, 56]. Установлено, что существует непосредственная связь между типом связывания порфирина, GC-содержанием и знаком индуцированных спектров кругового дихроизма (ИКД спектров), получающихся для исследованных комплексов металлопорфиринов с ДНК. Неаксиальные или 4-координационные металлопорфирины, как и безметалльные формы порфиринов, способны интеркалировать между парами оснований ДНК [56,63,64]. Металлопорфирины, содержащие аксиальные лиганды, не способны к интеркаляции, они встраиваются в желобок ДНК и образуют внешние комплексы. Данные по спектроскопии и круговому дихроизму приводят к заключению, что для *meso*-замещенных порфиринов комплексы, образованные с GC-богатыми участками, принципиально отличаются от комплексов, образованных с AT-богатыми участками [65,45,66].

Интеркалирующий комплекс (в GC-богатых участках) экспериментально характеризуются:

1. большим красным смещением максимума полосы Soret ($\geq 15\text{nm}$),
2. существенным гипохромизмом полосы Soret ($\geq 35\%$),
3. отрицательным ИКД сигналом на полосе Soret .

Порфирин-ДНК комплексы, сформированные путем внешнего связывания, характеризуются:

1. небольшим красным смещением максимума полосы Soret (≤ 8),
2. небольшой гипохромностью ($\leq 10\%$), или даже гиперхромностью полосы Soret,
3. положительным ИКД сигналом в области Soret.

Теоретические исследования показали, что интеркаляция, действительно, предпочтительнее желобкового связывания. Энергия взаимодействия интеркалирующего порфирина на одну GC - пару ~ 100 кДж, в то время как для внешнего связывания с AT- парами оснований ~ 40 кДж [45].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Водорастворимые мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирины (ТОЕРуР4) и его Cu(II)-и Co(II)-содержащие аналоги Cu(II)ТОЕРуР4 и Co(II)ТОЕРуР4, мезо-тетра-(4N-бутилпиридил) порфирины (ТВутРуР4), и его Cu(II)- и Co(II)-содержащие аналоги Cu(II)ТВутРуР4 и Co(II)ТВутРуР4 (см.схему) были синтезированы на кафедре фармакологической химии ЕМГУ по методике, описанной в работе [44] и любезно предоставлены нам доктором химических наук Робертом Казаряном.

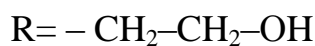
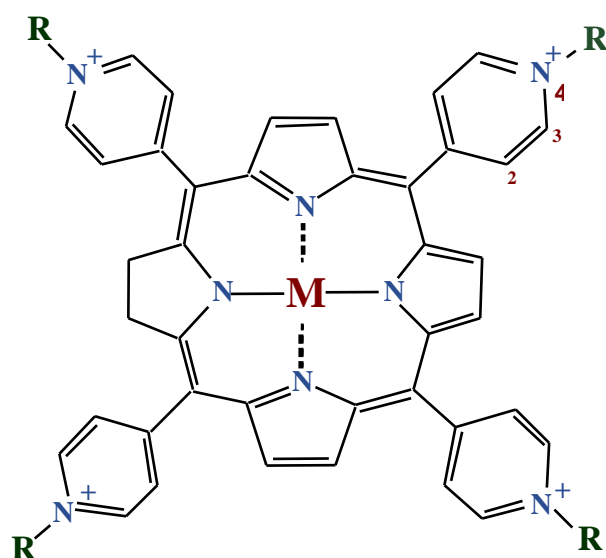


Рис. 11. Схема исследуемых порфиринов

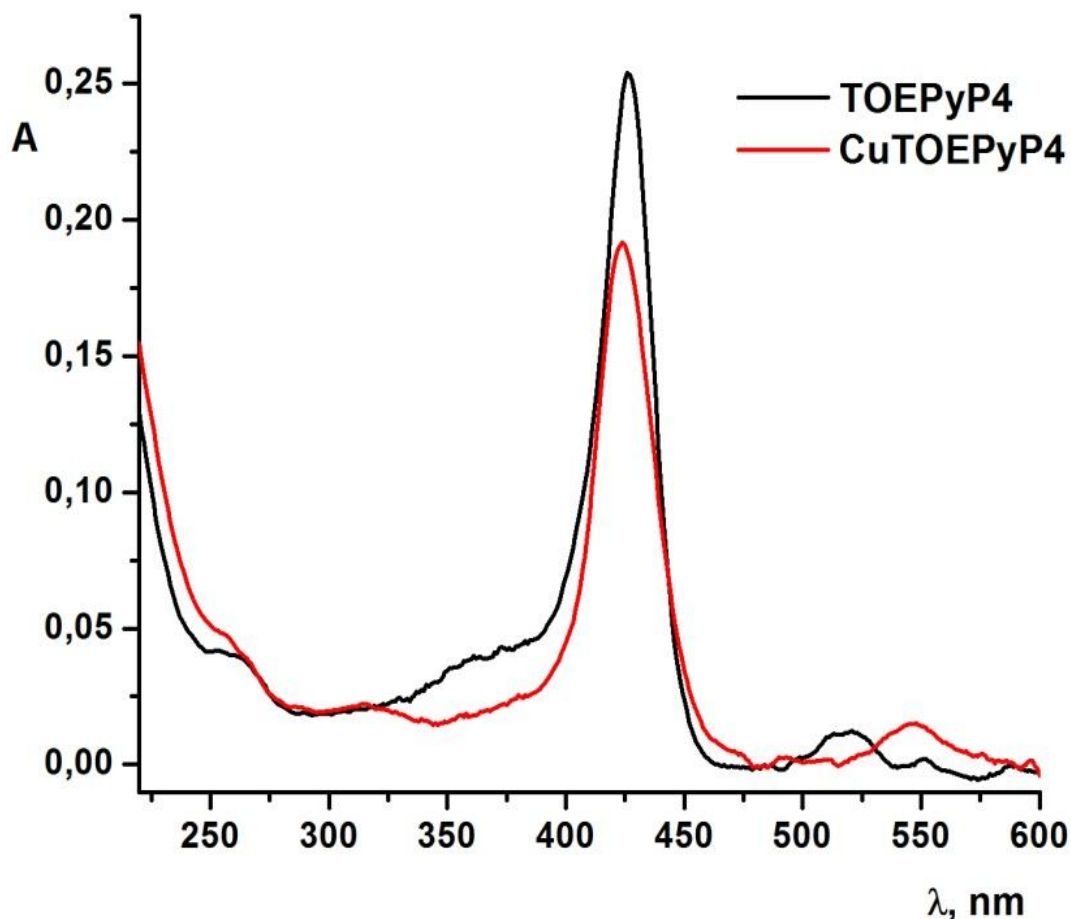


Рис. 12. Спектры поглощения порфиринов TOEPyP4 и CuTOEPyP4, $[Na^+]=0.001M$, при одинаковых концентрациях ($10^{-6}M$).

Как видно из рисунка спектр поглощения металлопорфирина CuTOEPyP4 отличается от спектра его безметального аналога, т.к. внедрение атома металла в центр порфирина существенно влияет на спектр поглощения в видимой области, где за поглощение ответственны $\pi - \pi^*$ переходы макрокольца порфирина.

Маточные концентрации порфирина готовились в дистиллированной воде (чтобы избежать самоагрегации) за час до эксперимента. Интервал использованных концентраций порфирина 10^{-6} – 10^{-3} М. Все порфирин-содержащие растворы хранились в темноте во избежание фотохимических модификаций и деструкций порфирина.

Сверхчистый препарат нативной ДНК тимуса теленка (ДНК тт) был выделен профессором Д. Ландо в Институте Биоорганической Химии, Минск, Беларусь. GC содержание ДНК тт, $X_{GC}=42\%$ (протеин $<0.1\%$, РНК $<0.1\%$, ММ ~ 30 MDa). Концентрация ДНК тт определялась спектрофотометрически, с использованием коэффициента экстинкции: $\epsilon_{260} = 13860$ моль $^{-1}$ см $^{-1}$ для ДНК. В диссертационной работе все концентрации ДНК выражены в парах оснований.

Исследования проводились в фосфатном буфере (BPSE = 6ммоль Na_2HPO_4 + 2ммоль NaH_2PO_4 + 185ммоль NaCl + 0.1ммоль EDTA, ионная сила $\mu=0.001$ М и $\mu=0.02$ М, рН 7.0) и в растворе 10^{-3} М NaCl с добавлением этилового спирта. При необходимости рН раствора доводили добавлением микроколичеств HCl или NaOH .

2.2 Методы

2.2.1 Абсорбционная спектроскопия

Спектры поглощения регистрировались в кварцевых кюветах (PerkinElmer) толщиной 1 см на спектрофотометре Lambda 800 (PerkinElmer) с температурным блоком системы Пельтье (РТР-6 PeltieSystems). Для определения концентрации порфиринов в растворах использовались следующие коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{422} = 2.26 \cdot 10^5$ моль $^{-1}$ см $^{-1}$ для ТОЕРуР4, $\epsilon_{431} = 6.95 \cdot 10^5$ моль $^{-1}$ см $^{-1}$ для СоТОЕРуР4, $\epsilon_{437} = 0.74 \cdot 10^5$ моль $^{-1}$ см $^{-1}$ для СоТВутРуР4 и $\epsilon_{427} = 1.08 \cdot 10^5$ моль $^{-1}$ см $^{-1}$ для CuТВутРуР4.

Абсорбционное титрование проводилось добавлением микроколичеств ДНК к неизменной концентрации порфирина $\sim 10^{-6}$ моль при одной и той же

температуре. Образцы с различными относительными порфирина/ДНК концентрациями были получены добавлением к 2мл раствора порфирина микроколичеств (2 ÷ 8 мкл) концентрированного (маточного) раствора ДНК с использованием шприцов Гамильтона (с объемом до 10 мкл). Во избежание кинетических эффектов необходимые спектры титрования регистрировались через строго определенные промежутки времени 3 мин. Все спектры регистрировались со скоростью 1нм/сек. Титрование проводилось до насыщения, т.е. до тех пор, пока на спектрах не наблюдаются изменения.

Гипохромность изменения поглощения порфирина при связывании с ДНК (%*h*) определялась из уравнения $h = (\varepsilon_f - \varepsilon_b) / \varepsilon_f \times 100$, где ε_f и ε_b коэффициенты экстинкции на максимуме пика Соре свободного (ε_f) и связанного ε_b порфирина с ДНК, соответственно.

2.2.2 Круговой дихроизм

В спектроскопических исследованиях особенное место занимает метод кругового дихроизма (КД). С помощью этого метода можно точно определить не только тип предпочтительного связывания данного порфирина с ДНК и полинуклеотидами, но и конформационные изменения молекулы ДНК [67,68].

Явление кругового дихроизма состоит в разном поглощении право- и левополяризованных по кругу компонентов плоскополяризованной волны некоторыми оптически активными веществами и обнаруживается только при определенных длинах волн в спектрах поглощения. Степень кругового дихроизма определяется разностью коэффициентов экстинкции для лево- и правополяризованной по кругу световой волны:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

где ε_L и ε_R — молярные коэффициенты экстинкции соответственно левого и правого циркулярно-поляризованного света с размерностью л · моль⁻¹ · см⁻¹.

Экспериментально обычно измеряют $\Delta\varepsilon$, но исторически принято при построении кривой КД откладывать эллиптичность θ . Величина θ связана с $\Delta\varepsilon$ уравнением $\theta = 3300\Delta\varepsilon$. Кривая, показывающая зависимость θ от длины волны называется кривой КД или спектром КД. Если вещество оптически неактивно, тогда поглощение обеих волн одинаково, тогда $\Delta\varepsilon = 0$. А для оптически активного вещества $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R > 0$ или $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R < 0$ и она, как правило, возрастает с увеличением асимметрии.

Молекула порфирина являясь симметричной, сама не обладает естественной оптической активностью и имеет нулевой дихроизм во всей области поглощения. Однако, при связывании, попав в асимметричную среду спиральной ДНК, порфирин приобретает оптическую активность, что отображается в спектрах КД ДНК-порфирин комплекса в виде индуцированной полосы в видимой области (ИКД спектры). Из литературы известно, что комплексы ДНК с порфиринами характеризуются двумя полосами КД [46,65,69]

- полоса 220-310 нм - УФ область, которая совпадает с полосой естественного КД ДНК,
- полоса 400-470 нм - полоса индуцированного КД, область, которая совпадает с областью поглощения *Sore*, где ДНК не поглощает.

При исследовании комплексообразования порфирина с ДНК используется вторая полоса, так как, ДНК не имеет КД спектров на этой полосе и появление индуцированного КД обусловлено взаимодействием порфирина с ДНК. Интерпретация КД спектра в УФ области затруднена эффектом наложения спектров КД ДНК и порфирина. Анализ индуцированного спектра КД позволяет сделать вывод о характере взаимодействия и, следовательно, о типе связывания порфирина с ДНК (см. раздел 1.3).

Спектры КД получались следующим образом: последовательно добавлялись микроколичества из маточного раствора порфирина к раствору ДНК с известной концентрацией, т.е. титровали ДНК порфирином.

Снимались спектры КД ДНК-порфирин комплекса при различных относительных концентрациях порфирина $r = C_{\text{порф}}/C_{\text{ДНК}}$ (r = концентрация порфирина/концентрацию ДНК) вплоть до некоторой концентрации, начиная с которой наблюдалась агрегация с дальнейшим выпадением комплекса в осадок.

Спектры КД снимались на Olis КД спектрофотометре. Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Спектральная область исследований 220 – 500 нм.

2.2.3 Плавление ДНК

Переход спираль - клубок ДНК это процесс, при котором рвутся водородные связи между комплементарными парами оснований и двуспиральная молекула ДНК распадается на два клубка из отдельных полинуклеотидных нитей. Этот процесс также называется плавлением (денатурацией) ДНК [70-72]. Плавление ДНК можно наблюдать различными методами: оптическими (поглощение, оптическая активность), микрокалориметрическим и т. д.. Спектрофотометрический метод исследования плавления ДНК основан на явлении гипохромного эффекта полосы поглощения, Известно, что в УФ-области спектров (260 нм) поглощение ДНК в клубкообразной форме примерно на ~ 30-40% больше значения поглощения в спиральной форме.

Для описания перехода спираль-клубок, необходимо найти зависимость I - θ от T , где θ - степень спиральности ДНК. θ определяется следующим соотношением:

$$\theta = \frac{A_{\max} - A_T}{A_{\max} - A_{\min}},$$

Где $A_{мин}$ - поглощение двуспиральной ДНК, $A_{макс}$ -поглощение денатурированной ДНК, а A_T — поглощение частично расплавленной ДНК, измеренное при любой температуре.

Кривую плавления удобно характеризовать двумя параметрами — температурой плавления T_m , отвечающей точке перегиба кривой ($1 - \theta = 0.5$) и шириной интервала плавления ΔT , равной, разности температур, при которых касательная в точке перегиба пересекает уровни $\theta = 0$ и $\theta = 1$ (θ — степень спиральности, т. е. доля звеньев в спиральном состоянии).

Температура плавления ДНК существенно зависит от среды, в которой растворены молекулы. Обычно ДНК находится в солевом растворе, причем, как правило, используются соли натрия. Температура плавления ДНК растет с увеличением ионной силы раствора приблизительно пропорционально логарифму концентрации катионов [73-76].

Кривые плавления ДНК были получены в бифосфатном буфере (BPSE) на спектрофотометре Lambda 800 (Perkin Elmer) в плотно закрывающихся кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 1.3 мл. Чтобы избежать кинетических процессов в процессе плавления мы выбрали оптимальную скорость нагрева: 1°C / минуту.

2.3 Получение А-конформации ДНК

Из литературы известно, что добавление этанола в раствор В-ДНК приводит к В-А конформационному переходу. Переход происходит в очень узком диапазоне концентраций спирта – 70 – 80 %. В - А переход не зависит от температуры, и легче происходит в GC - богатых ДНК [77-79]. О форме спирали ДНК принято судить по форме спектров КД. Поэтому нами были сняты КД спектры ДНК в растворе, содержащем различные пропорции этанола.

Концентрация ДНК и ионные условия раствора $[Na^+]=10^{-3}M$ и температура были одинаковыми (рис.13).

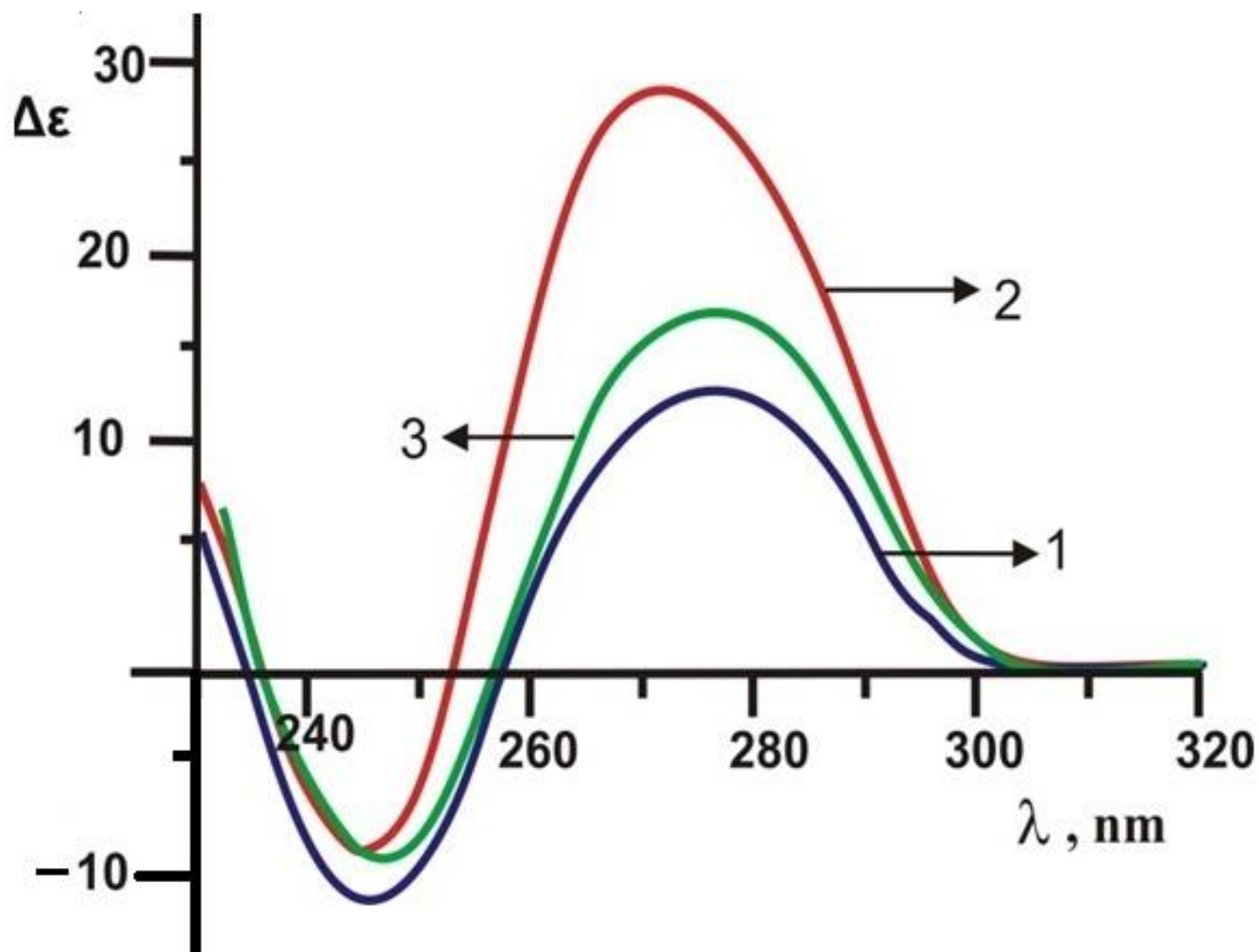


Рис. 13. КД спектры ДНК в растворах различных концентраций этанола: 1) при отсутствии этанола, 2) при 72% этанола, 3) при 73% этанола. Ионная сила $[Na^+]=10^{-3}M$, $25^{\circ}C$.

Из рисунка 13 видно, что добавление этанола в раствор В-формы ДНК (кривая 1) приводит к изменению формы спектра КД.

Добавление спирта в диапазоне концентраций 0-65% практически не изменяет вид спектра КД ДНК т.е. ДНК все еще находится в В-форме. Как видно из рисунка, при концентрации 72% спирта происходит резкое увеличение (примерно вдвое) амплитуды положительной полосы спектра КД (кривая 2) и сдвиг точки кроссовера в сторону низких длин волн (-250нм). Полученный результат свидетельствует, что произошел переход ДНК в А-форму [80,81]. Но поскольку переход в А-форму может происходить только в GC-богатых и избирательных AT-богатых участках ДНК, следовательно в интервале В-А перехода ДНК представляет смесь В-ДНК и А-ДНК [82]. Нас заинтересовал вопрос при 72% содержании спирта (кривая 2) все ли участки ДНК, способные совершить переход, перешли в А-конформацию и можно ли считать переход завершенным. Для ответа на этот вопрос мы увеличили концентрацию спирта на 1% и прописали спектр КД (кривая 3). Как видно из рис.13 (кривая 3) амплитуда положительной полосы снизилась, что свидетельствует в пользу уменьшения фракции А-формы. Возможно это связано с агрегационными эффектами и переходом ДНК в более компактную форму.

Следовательно при концентрации 72% спирта в растворе низкой ионной силы $[Na^+]=10^{-3}M$ при комнатной температуре ДНК находится в А-конформации.

2.4 Расчет параметров связывания и термодинамика

2.4.1 Параметры связывания

Простейшая модель, предложенная Макги и вон-Хиппелем для расчета параметров связывания (константа связывания K_b и стехиометрия n , которая также называется параметром исключения) лигандов с ДНК, рассматривает ДНК как бесконечную линейную структуру, состоящую из идентичных и

невзаимодействующих центров связывания. Макги и вон-Хиппель вывели формулу (1974), учитывающую исключение соседних участков и легко поддающуюся анализу методом наименьших квадратов [83]. Изотерма связывания для этой некооперативной модели, описывается следующим уравнением [1]:

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

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

Параметр исключения n выражает число пар оснований, которые становятся недоступными при связывании одного лиганда. Оно может быть обусловлено как непосредственным физическим перекрыванием, так и другими механизмами (такими как: структурные деформации участков ДНК вблизи непосредственного места связывания, изменение гидратного слоя и т.д. [84].

В 1994 г. Коррея и Чеарс предложили использовать уравнение (1) в несколько измененном виде [85]. Простой перестановкой можно получить зависимость C_f от остальных параметров:

$$C_f = r \left(\frac{1-nr}{1-nr+r} \right)^{-n} [K_b(1-nr+r)]^{-1} \quad (2)$$

Формула (2) имеет ряд преимуществ по сравнению с (1). Во-первых, в ней не используется отношение r/C_f , где умножаются, а значит амплифицируются возможные экспериментальные ошибки C_f и r . Во-вторых, оно легче поддается анализу компьютерных алгоритмов по нахождению параметров методом наименьших квадратов.

Вычисление стехиометрии и константы связывания лигандов с макромолекулами помогает решению вопросов, связанных с механизмом и

избирательностью связывания. В этой работе было использовано уравнение (2) для расчетов констант связывания.

Приведем несколько известных примеров связывания порфиринов с В-ДНК: константа связывания лигандов, связывающихся в желобке, K_b обычно находится в пределах 10^5 – 10^9 моль⁻¹. Константы связывания K_b для интеркаляторов обычно $\sim 10^6$ моль⁻¹ (в том числе и для порфиринов, интеркалирующих в ДНК, а для связывающихся внешне или частично интеркалирующих порфиринов $K_b \sim 10^4$ моль⁻¹ [42,49,64].

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

2.4.2. Термодинамика связывания

Для достоверного интерпретирования полученных результатов необходимо дополнить их термодинамическими данными [86]. Основным критерием термодинамической стабильности образованного комплекса является разница значений свободной энергии Гиббса начального и конечного состояний (ΔG_b), определяемая по формуле

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

где K_b – константа связывания, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Для понимания природы взаимодействий, стабилизирующих комплекс, свободную энергию Гиббса можно представить в виде суммы двух частей – энтальпийной и энтропийной:

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

Для прямого измерения изменения энтальпии перехода (ΔH_b), теплоты, выделенной или поглощенной в процессе реакции комплексообразования, наиболее часто пользуются методами изотермической колориметрии (ИТК) или дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Однако из-за сильной агрегации комплекса ДНК-порфирин при высоких концентрациях ДНК, необходимых в калориметрических измерениях, эти прямые методы невозможно применить.

В подобных случаях на помощь приходит предложенный Вант-Гоффом метод определения термодинамических потенциалов связывания лигандов с ДНК на основании спектральных измерений, не требующих высоких концентраций ДНК.

Метод Вант Гоффа— является косвенным, зависящим не только от точности эксперимента, но и от выбранной для расчета K_b модели. Этот метод, вполне может служить в качестве альтернативы основным прямым методам, если известна температурная зависимость равновесной константы связывания [87].

Для обратимых реакций ΔH_b характеризует температурную зависимость константы связывания K_b через соотношение Вант Гоффа

$$\Delta H_b = -R \left[\frac{\partial \ln K_b}{\partial (1/T)} \right]_p \quad (5)$$

где R – газовая постоянная, T - абсолютная температура.

Как видно из формулы (5) для определения энтальпии связывания необходимо установить температурную зависимость константы связывания K_b . Для этого выполняется титрование при минимум четырех температурах, лежащих обычно в области температур до начала плавления нуклеиновых кислот (для нашего случая это область от 5 °С до 40°С). Диаграмму Вант Гоффа получаем при помощи зависимости $\ln K_b$ от обратной температуры $1/T$.

На диаграмме Вант Гоффа через полученные точки проводится прямая линия методом наименьших квадратов, и энтальпия считается по наклону прямой (график зависимости $\ln K_b$ от $1/T$).

Изменение энтропии ΔS_b в процессе связывания можно рассчитать из разницы свободной энергии и энтальпии по формуле (4).

В этой работе подобным методом были исследованы термодинамические потенциалы (ΔG_b , ΔH_b , ΔS_b) порфирина-ДНК комплексов. Анализ термодинамических характеристик комплексообразования может существенно облегчить установление механизма связывания. По значениям энергетических параметров можно сделать предварительные выводы о природе сил, стабилизирующих комплекс [88,89].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Особенности взаимодействия порфиринов с

А-формой ДНК

Как было сказано выше, механизм взаимодействия катионических порфиринов с ДНК сильно зависит от их характеристик: таких как нуклеотидная последовательность и конформационное состояние ДНК, а также расположение бокового радикала и тип центрального металла в порфиринах (см. раздел §1.3). На сегодняшний день в литературе практически нет данных о механизмах связывания порфиринов с формами ДНК, отличными от В-формы, например, с А-формой ДНК. Учитывая, что в А-конформацию ДНК может принимать в условиях низкой ионной силы ($[Na^+]=0.001M$), то сравниваться полученные результаты могут с данными по В-ДНК, полученными в тех же ионных условиях. Отметим, что при таких низких ионных силах В-ДНК слабо стабилизирована и быстро реагирует на малейшие изменения условий среды. Более детально влияние ионной силы на связывание порфиринов с В-ДНК также было исследовано и описано в следующей главе.

Данная глава посвящена сравнительному исследованию взаимодействия водорастворимого мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (ТОЕРуР4), Cu-содержащего водорастворимого мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (CuТОЕРуР4) и Co(II)-содержащего водорастворимого мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (CoТОЕРуР4) с А-ДНК и В-ДНК в условиях низких ионных сил.

3.1 Взаимодействие ТОЕРуР4 с А-формой ДНК

3.1.1. Спектры поглощения ТОЕРуР4-ДНК комплексов

На рисунке 14(а) и 14(б) приведены спектры поглощения комплексов ТОЕРуР4 с А-ДНК и В-ДНК при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, $25^{\circ}C$.

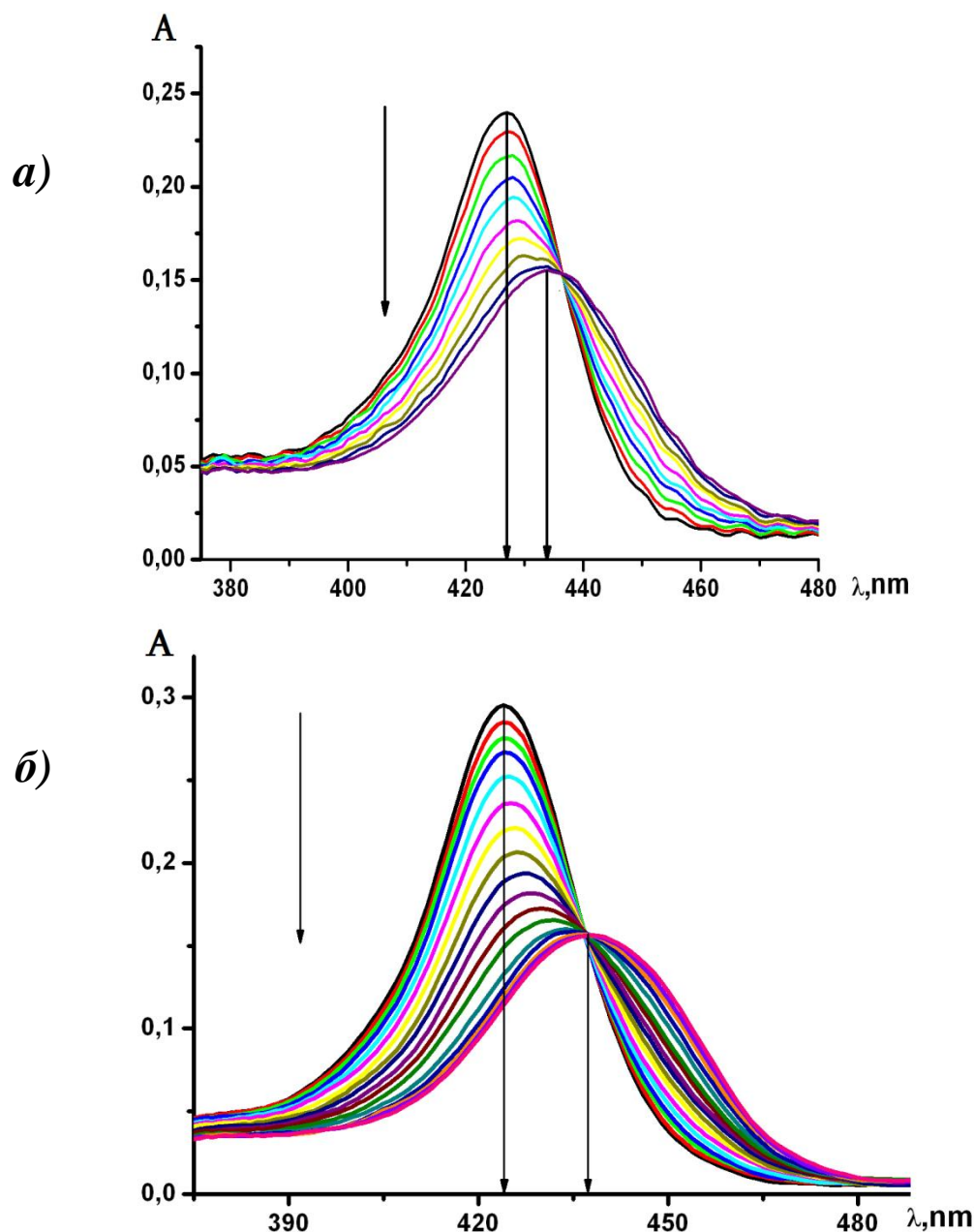


Рис. 14. Спектры поглощения ТОЕРуР4/А-ДНК (а) и ТОЕРуР4/В-ДНК (б) при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, $25^{\circ}C$, рН 7.1. Концентрация порфирина $10^{-6}M/mL$. Концентрация добавляемого маточного раствора А- и В-ДНК $\sim 1.5 \cdot 10^{-4}M$ пар оснований/ mL . Направление увеличения концентрации ДНК показано стрелкой.

Как видно из рис.14(а, б), добавление ДНК к раствору порфирина ТОЕРуР4 приводит к красному сдвигу($\Delta\lambda$) максимума полосы поглощения Соре и к его гипохромизму(Δh). Для А-ДНК $\Delta\lambda = 7$ нм и $\Delta h \sim 35.2\%$, а для В-ДНК $\Delta\lambda = 13$ нм, а $\Delta h \sim 43.1\%$. Большой красный сдвиг и сильный гипохромизм, характерен для интеркаляционного механизма связывания порфиринов с В-ДНК. Однако, несмотря на то, что характер изменения спектров поглощения комплексов ТОЕРуР4/А-ДНК(а) и ТОЕРуР4/В-ДНК(б) с ростом концентрации ДНК практически не отличаются друг от друга, по величине гипохромизма и красного смещения на спектрах титрования невозможно сделать однозначного вывода о механизме связывания порфиринов с А-ДНК. Для определения предпочтительного механизма связывания порфирина с А- и В- формами ДНК нами были проанализированы спектры кругового дихроизма этих комплексов.

3.1.2. Круговой дихроизм ТОЕРуР4-ДНК комплексов

Из литературы известно, что по знаку индуцированного КД (ИКД) спектра можно судить о механизмах связывания порфирина с ДНК: положительный ИКД - признак внешнего связывания, а отрицательный – интеркаляции. Для выявления механизмов связывания были сняты спектры КД комплексов ТОЕРуР4 порфирина с А- и В-ДНК.

На рисунке 15 приведены спектры кругового дихроизма ТОЕРуР4/А-ДНК(а) и ТОЕРуР4/В-ДНК(б) при различных значениях относительной концентрации порфирина τ . Из рисунка 15 видно, что с повышением концентрации порфирина спектры КД ТОЕРуР4/А-ДНК(рис.15а) и ТОЕРуР4/В-ДНК(рис.15б) комплексов изменяются по-разному. 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.

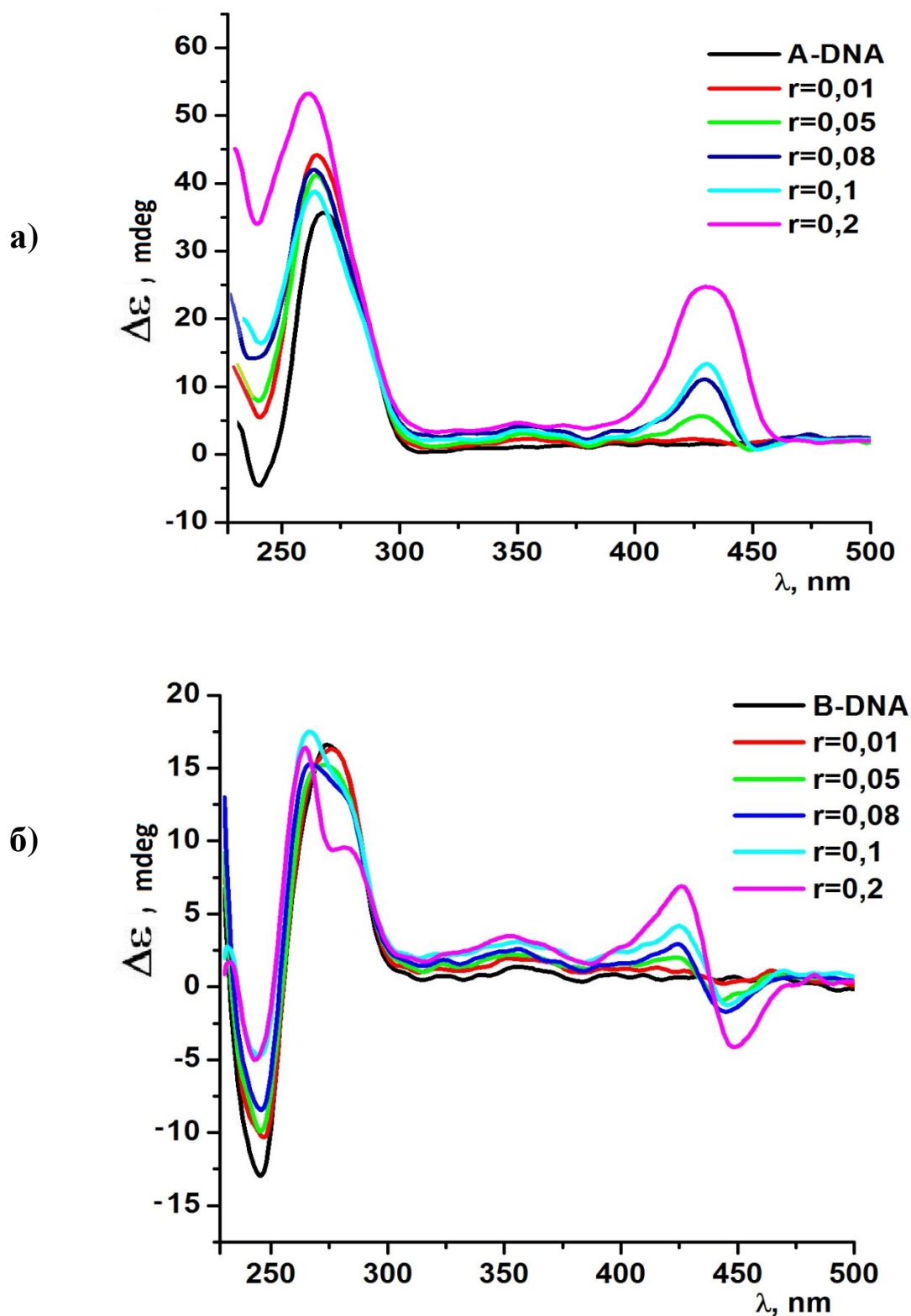


Рис.15. Спектры кругового дихроизма ТОЕРуР4 порфирина с А-ДНК (а) и с В-ДНК (б) при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, $25\text{ }^{\circ}C$, рН 7.1. Концентрации растворов А- и В- ДНК в эксперименте одинаковы и равны $\sim 7.5 \cdot 10^{-5}M$ пар оснований/ mL . Относительная концентрация добавляемого порфирина (r) указана на рисунках.

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.15б) 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 [90,91]. Ответ на вопрос какой тип связывания предпочтителен в данном случае может дать термодинамический анализ взаимодействия.

3.1.3. Расчет параметров связывания ТОЕРуР4 с ДНК.

Для количественного анализа исследуемых комплексов, используем метод расчета параметров связывания применяемых для модели двух состояний [83-85, 92-95]. Мы предполагаем, что при тех концентрациях, когда на спектрах титрования комплексов наблюдается изобестическая точка, реализуется один механизм взаимодействия. Для этой области концентраций, можно оценить константу связывания (K) и стехиометрию (n) комплекса. Для этого, используя данные оптического поглощения (по данным рисунка 14), были построены изотермы связывания для каждого комплекса. Изотермы связывания для ТОЕРуР4/А-ДНК и ТОЕРуР4/В-ДНК комплексов приведены на рисунке 16(а и б). Для расчета параметров связывания использовалось уравнение (1), предложенное Коррея и Чеарсом (раздел Материалы и методы). В таблице 1 приведены рассчитанные по этим кривым параметры связывания ТОЕРуР4 с А-ДНК и В-ДНК.

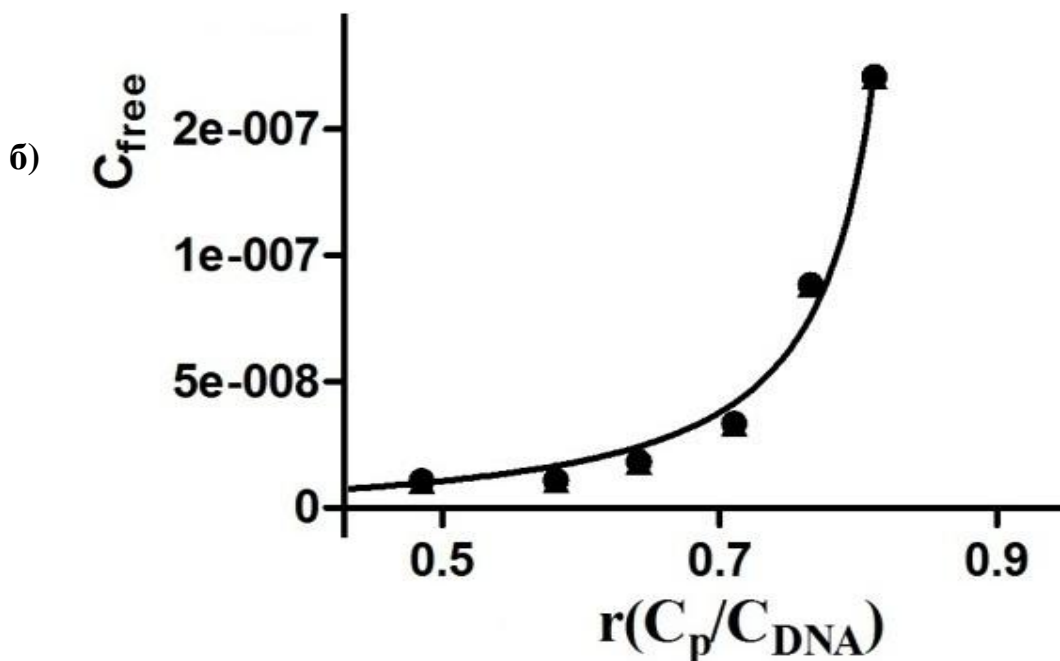
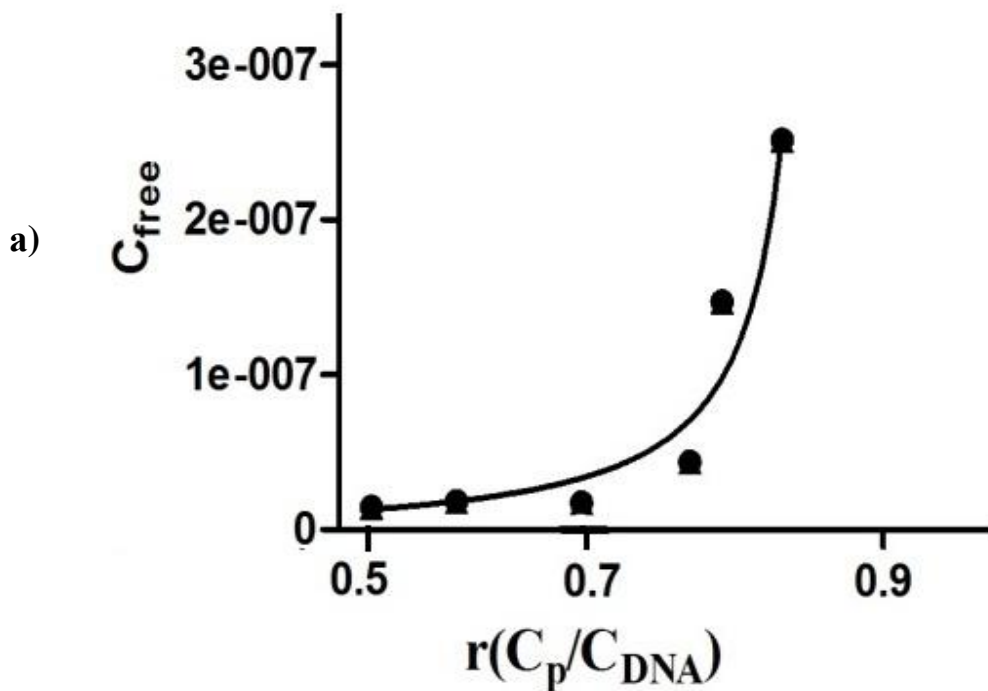


Рис.16. Кривые зависимости концентрации свободного порфирина от относительной концентрации r для комплексов ТОЕРуР4/А-ДНК(а) и ТОЕРуР4/В-ДНК (б), при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, $25\text{ }^\circ C$, $pH\ 7.1$. (Точки-экспериментально полученные значения).

Таблица 1. Параметры связывания ТОЕРуР4 с разными формами ДНК при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, 25 °С, рН 7.1.

Порфирин	Форма ДНК	$K_b \times 10^7, M^{-1}$	n
ТОЕРуР4	А	13.2±0.61	1.2±0.02
	В	6.1±0.14	1.1±0.01

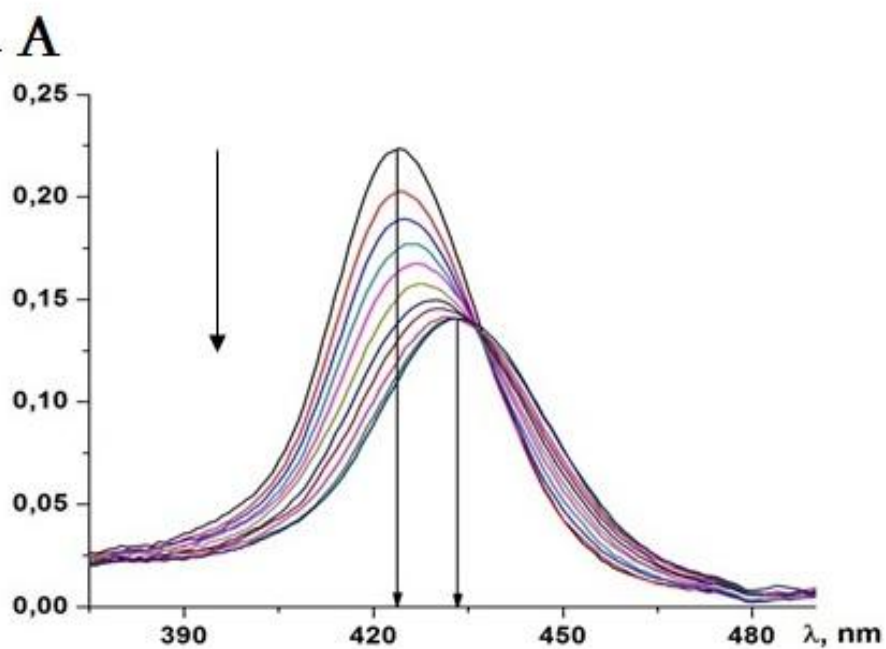
Как видно из Таблицы 1, константа связывания ТОЕРуР4 с А-ДНК вдвое больше, чем с В-ДНК. Следовательно, можно предположить, что безметалльный порфирин ТОЕРуР4 лучше взаимодействует с А-ДНК, чем с В-ДНК. Стехиометрии (n) обоих комплексов практически не отличаются. Близкие к единице значения n указывают на предпочтительное внешнее связывание ТОЕРуР4 с А-ДНК и В-ДНК.

3.2. Взаимодействие CuТОЕРуР4 с А-формой ДНК

3.2.1. Спектры поглощения CuТОЕРуР4-ДНК комплексов

На рисунке 17 приведены спектры титрования CuТОЕРуР4 раствором А-ДНК(а) и с В-ДНК(б) при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, 25°С.

а)



б)

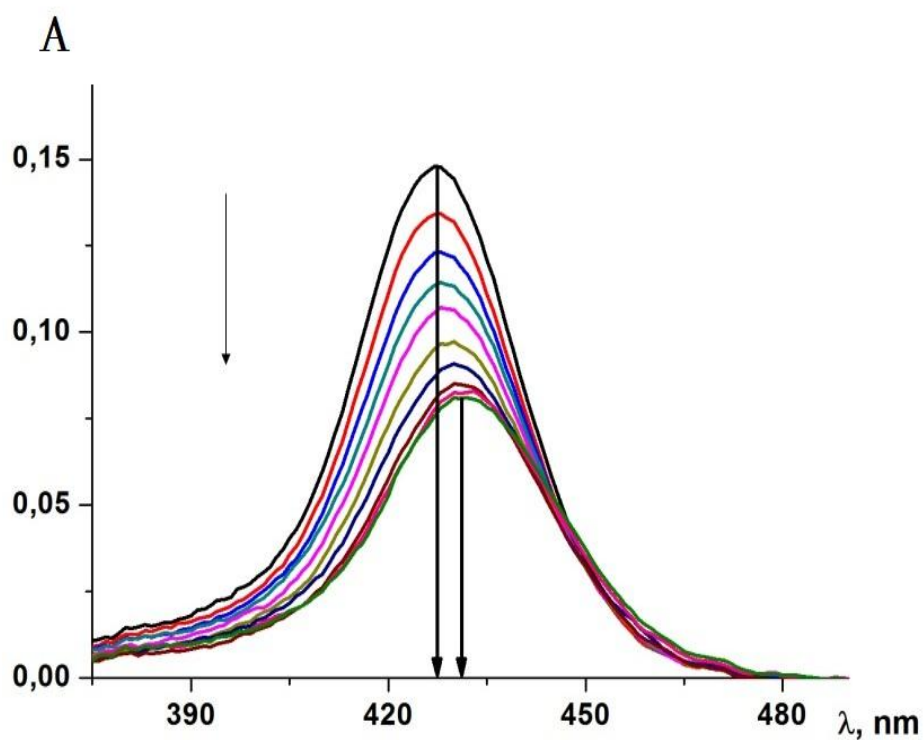


Рис. 17. Спектры поглощения CuTOEPyP4/A-ДНК(а) и CuTOEPyP4/B-ДНК(б) при ионной силе $[Na^+] = 0.001M$, $25^\circ C$, pH 7.1. Концентрация раствора порфирина $10^{-6}M/mL$. Концентрация маточного раствора А- и В-ДНК $\sim 1.5 \cdot 10^{-4}M$ пар оснований/ mL . Направление увеличения концентрации ДНК показано стрелкой.

Как видно из рис. 17(а,б) при связывании CuТOEPyP4 с А- и В-ДНК поглощение на полосе Sore уменьшается и сдвигается в сторону длинных волн с возрастанием концентрации добавляемой ДНК. Из приведенных рисунков видно, что взаимодействие порфирина с обоими формами ДНК приводит к красному сдвигу максимума полосы поглощения Sore ($\Delta\lambda$) и к его гипохромизму (Δh). Для А-ДНК $\Delta\lambda = 9$ нм и $\Delta h \sim 31.2\%$, а для В-ДНК $\Delta\lambda = 5$ нм, а $\Delta h \sim 45.1\%$. Характерной особенностью данных спектров является наличие изобестической точки (для А-ДНК практически во всей области изменения концентрации ДНК, а для В-ДНК при низких концентрациях добавляемой ДНК).

Однако для установления предпочтительного механизма связывания этого порфирина с А- и В- формами ДНК важную информацию дает анализ формы индуцированных спектров кругового дихроизма комплексов.

3.2.2. Круговой дихроизм CuТOEPyP4-ДНК комплексов

На рисунке 18 приведены спектры кругового дихроизма CuТOEPyP4/А-ДНК(а) и CuТOEPyP4/В-ДНК(б) при различных значениях относительной концентрации порфирина g .

Как видно из рисунка спектры ИКД комплексов CuТOEPyP4/А-ДНК (рис.18а) и CuТOEPyP4/В-ДНК (рис.18б) сильно отличаются. С увеличением концентрации порфирина CuТOEPyP4 в растворе А-ДНК слабая отрицательная полоса ИКД спектра исчезает, а положительная сильно растет (до значений $g=0.3$) (рис.18а). Это является признаком сильного внешнего связывания порфирина с А-ДНК.

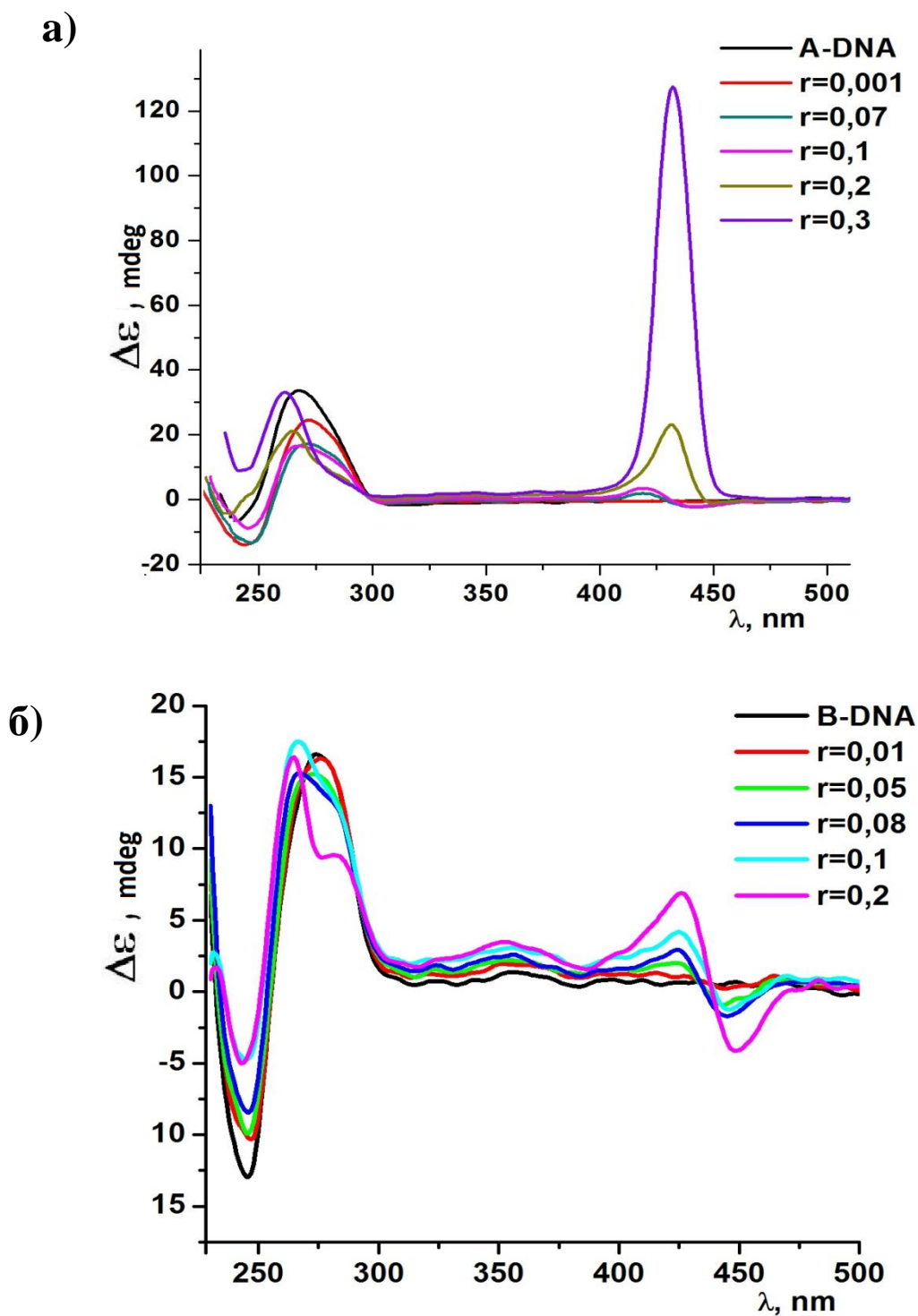


Рис. 18. Спектры кругового дихроизма CuTOEPyP4 порфирина с А-ДНК(а) и с В-ДНК(б) при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, $25^{\circ}C$, рН 7.1. Концентрации растворов А- и В- ДНК в эксперименте одинаковы и равны $\sim 7.5 \cdot 10^{-5}M$ пар оснований/ mL . Относительная концентрация добавляемого порфирина (r) указана на рисунках.

ИКД спектры комплекса CuТОЕРуР4с В-ДНК (рис.18б) характеризуются слабой консервативной полосой (с положительной и отрицательной частями с почти одинаковой интенсивностью). В отличие от комплекса с А-ДНК, бисигнальный характер формы индуцированной полосы CuТОЕРуР4/В-ДНК комплекса не меняется с увеличением концентрации порфирина, только интенсивность отрицательной полосы превышает интенсивность положительной при относительно высоких концентрациях порфирина.

На основании анализа ИКД спектров можно заключить, что CuТОЕРуР4 предпочитает связываться с А-ДНК путем интеркаляции при малых относительных концентрациях, а при больших значениях относительной концентрации Γ происходит внешнее связывание. С В-ДНК связывание происходит в основном путем интеркаляции [96].

3.2.3. Расчет параметров связывания CuТОЕРуР4 с ДНК.

Используя данные оптического поглощения (из рисунка 17) были построены изотермы связывания для каждого комплекса.

Для расчета параметров связывания CuТОЕРуР4/А-ДНК и CuТОЕРуР4/В-ДНК комплексов использовалось уравнение (1) (раздел Материалы и методы). В таблице 2 приведены рассчитанные параметры связывания CuТОЕРуР4 с А-ДНК и В-ДНК.

Согласно приведенным данным в Таблице 2, константа связывания CuТОЕРуР4 с А-ДНК примерно в 2 раза больше, чем с В-ДНК. Следовательно, CuТОЕРуР4 сильнее связывается с А-ДНК, чем с В-ДНК. Кроме того, значения констант связывания находятся в диапазоне 10^8 моль⁻¹, что указывает на более сильное связывание CuТОЕРуР4 порфирина по сравнению с безметальным ТОЕРуР4.

Таблица 2. Параметры связывания CuТОЕРуР4 с разными формами ДНК при $[Na^+]=0.001M$, 25 °С, рН 7.1

Порфирин	Форма ДНК	$K_b \times 10^8 M^{-1}$	n
CuТОЕРуР4	А	3.78±0.11	1.5±0.011
	В	1.59±0.2	1±0.002

Таким образом, результаты полученные методом абсорбции и КД позволяют сделать следующие выводы:

- Взаимодействие CuТОЕРуР4 с А-ДНК, происходит преимущественно путем внешнего связывания.
- При взаимодействии CuТОЕРуР4 с В-ДНК имеет место как внешнее, так и интеркаляционное связывание.

3.3 Взаимодействие СоТОЕРуР4 с А-формой ДНК

3.3.1.Спектры поглощения СоТОЕРуР4-ДНК комплексов

На рисунке 19 приведены спектры поглощения комплексов СоТОЕРуР4/А-ДНК(а) и СоТОЕРуР4/В-ДНК(б) при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, 25°С. Анализ поведения спектров титрования порфирина раствором ДНК показывает, что связывание СоТОЕРуР4 с А- и В-ДНК приводит к маленькому красному сдвигу ($\Delta\lambda$) максимума полосы поглощения порфирина на 1нм и 2нм и к его гипохромизму на ~19.1%, ~13.5%, для А- и В-ДНК, соответственно.

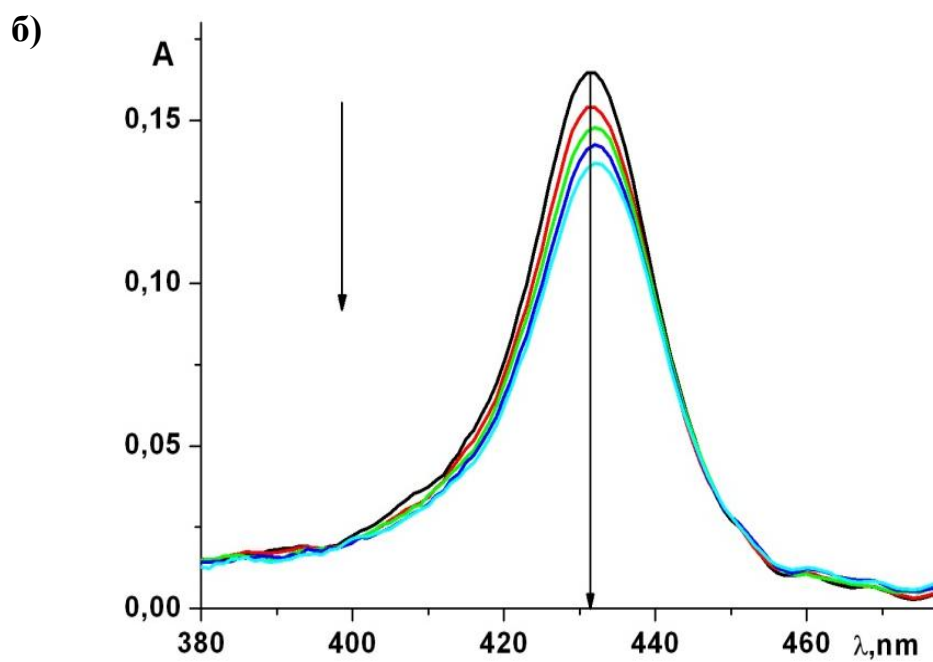
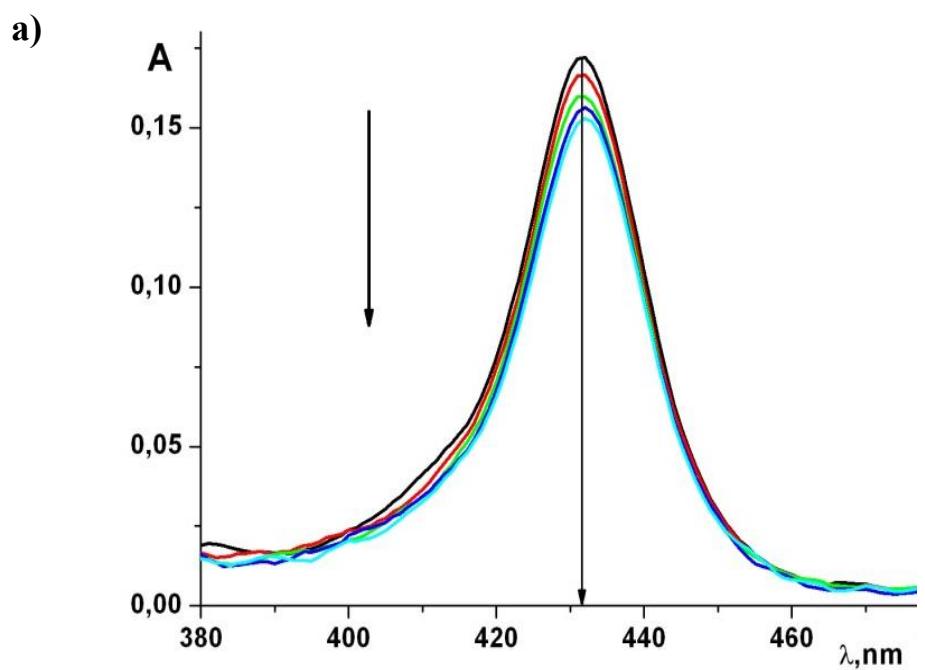


Рис. 19. Спектры поглощения CoTOEPyP4/A-ДНК(а) и CoTOEPyP4/B-ДНК(б), при ионной силе $[Na^+] = 0.001M$, $25\text{ }^\circ C$, рН 7.1. Концентрация маточного раствора порфирина $10^{-6}M$. Концентрация добавляемого маточного раствора А- и В-ДНК $\sim 4.5 \cdot 10^{-4}M$ пар оснований/ mL .

Известно, что наблюдаемые небольшое красное смещение полосы $Sore$ и маленькая гипохромность характерны для внешнего связывания порфиринов со стабильной В-формой ДНК (при относительно высоких ионных силах) [97].

Так как характеры изменения спектров поглощения комплексов $CoTOEPyP4/A$ -ДНК (рис. 19а) и $CoTOEPyP4/B$ -ДНК (рис. 19б) с увеличением концентрации ДНК практически не отличаются друг от друга, то по полученным из анализа спектров титрования данным можно предположить, что Со-порфирин предпочитает связываться с обоими формами ДНК внешне. Для получения доказательств реализации подобного типа взаимодействия, как и в предыдущем случае, нами были получены и проанализированы спектры кругового дихроизма (КД) комплексов ДНК с Со-порфирином.

3.3.2. Круговой дихроизм $CoTOEPyP4$ -ДНК комплексов

На рисунке 20 отображены спектры КД $CoTOEPyP4/A$ -ДНК(а) и $CoTOEPyP4/B$ -ДНК(б) комплексов при различных значениях относительной концентрации r ($r = \text{порф.}/\text{ДНК}$).

Из рисунка видно, что характер взаимодействия $CoTOEPyP4$ с А- и В-ДНК одинаков: на ИКД спектрах $CoTOEPyP4/A$ -ДНК(а) и $CoTOEPyP4/B$ -ДНК(б) комплексов наблюдается только положительная полоса. С увеличением относительной концентрации порфирина интенсивность этой полосы растет, а форма спектра не меняется. При относительной концентрации порфирина $r=0.3$ происходит агрегация ДНК-порфирин комплекса.

Полученный результат свидетельствует о том, что $CoTOEPyP4$ взаимодействует как с А-ДНК, так и с В-ДНК только путем внешнего связывания. Скорее всего, подобный характер взаимодействия обусловлен стерическими особенностями Со-содержащего порфирина.

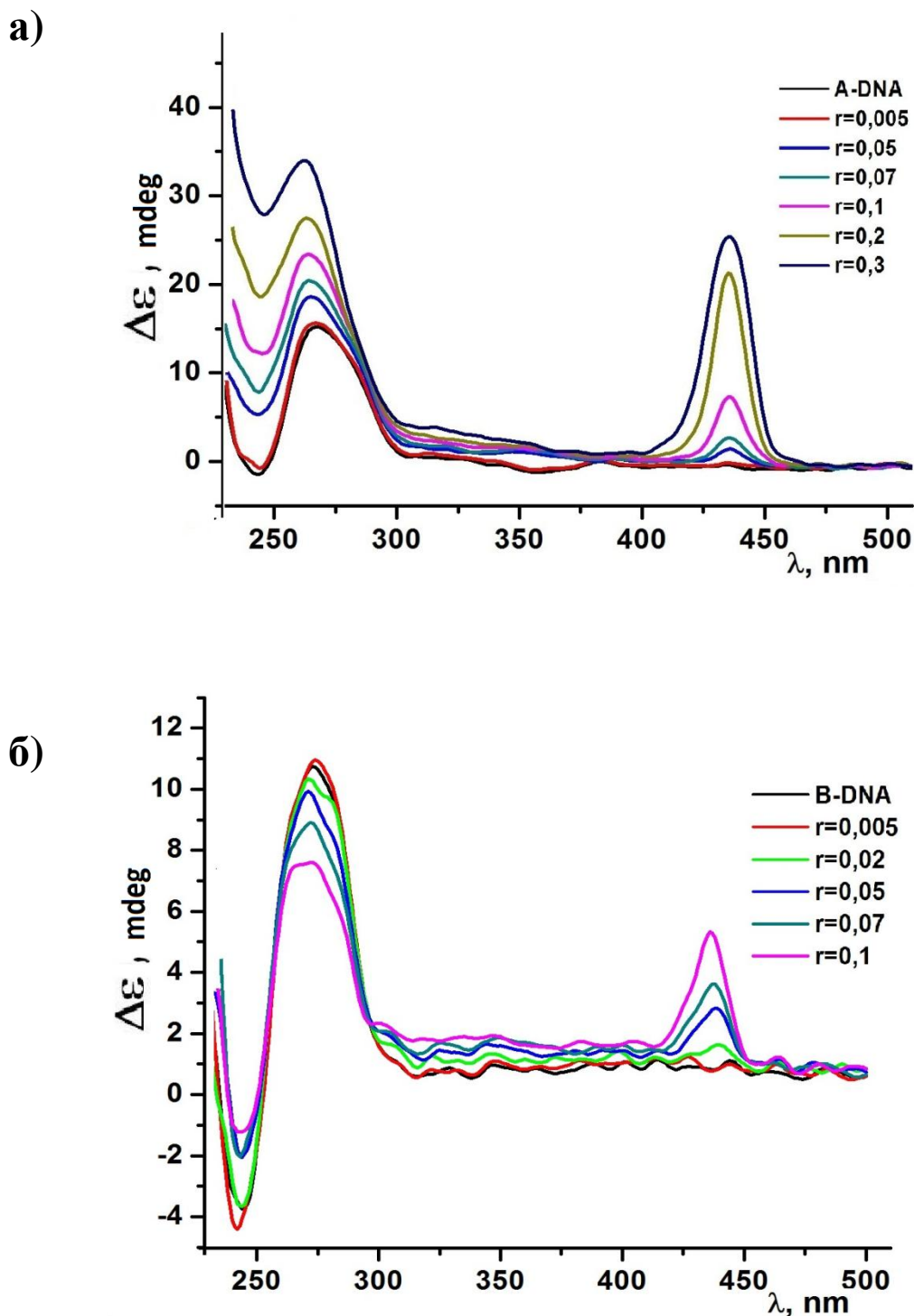


Рис. 20. Спектры кругового дихроизма CoTOEPyP4 порфирина с А-ДНК (а) и с В-ДНК(б), при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, $25\text{ }^\circ C$, pH 7.1. Концентрации растворов А- и В- ДНК в эксперименте одинаковы и равны $\sim 7.5 \cdot 10^{-5} M$ пар оснований/ mL . Относительная концентрация добавляемого порфирина (r) указана на рисунках.

3.3.3. Расчет параметров связывания CoТОЕРуР4 с ДНК.

Для того, чтобы оценить с какой из форм ДНК Со-порфирин связывается сильнее мы, по полученным экспериментальным данным, рассчитали константу связывания (K) и стехиометрию (n) комплекса по формуле (1) (раздел Материалы и методы) для каждого СоТОЕРуР4/А-ДНК и СоТОЕРуР4/В-ДНК комплекса.

По зависимости изменения оптической плотности от относительной концентрации порфирина были построены изотермы связывания для каждого комплекса с А-ДНК и В-ДНК, и рассчитаны параметры связывания. В таблице 3 приведены рассчитанные параметры связывания СоТОЕРуР4 с А-ДНК и В-ДНК.

Таблица 3. Параметры связывания СоТОЕРуР4 с разными формами ДНК при ионной силе $[Na^+]=0.001M$, 25 °С, рН 7.1

Порфирин	Форма ДНК	$K_b \times 10^7 M^{-1}$	n
СоТОЕРуР4	А	2.6±0.72	1.3±0.03
	В	3.8±0.87	1.1±0.05

Как видно из Таблицы 3, константы связывания СоТОЕРуР4 с А- и В-ДНК почти одинаковы - $10^7 M^{-1}$ порядка. Также отметим, что параметр исключения (n) для обоих комплексов порядка единицы, что характерно для внешнего упорядоченного связывания.

Таким образом можно заключить, что СоТОЕРуР4с В-ДНК и А-ДНК связывается только путем внешнего связывания.

3.4 Термодинамика связывания порфиринов с А- и В-формами ДНК

Для полноты характеристики стабильности комплексов порфиринов с А- и В-формами ДНК помимо структурных данных необходимо получить также энергетические (в данном случае, термодинамические) характеристики образованного комплекса. Основным критерием термодинамической стабильности образованного ДНК-порфирин комплекса является значение изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) при связывании, определяемая по формуле $\Delta G_b = -RT \ln K_b$, где K_b – константа связывания. Изменение свободной энергии Гиббса в свою очередь имеет энтальпийную и энтропийную составляющие, по изменению которых можно сделать вывод о механизме связывания порфиринов с А- и В-формами ДНК (см. раздел 2, формула (3)).

Прямыми калориметрическими методами определение изменения энтальпии (ΔH_b) и энтропии (ΔS_b) при комплексообразовании невозможно, так как концентрация ДНК в калориметрических измерениях примерно в 20 раз выше, чем при спектральных исследованиях. И соответственно, в калориметрических экспериментах для получения таких же относительных концентраций порфиринов, как в спектральных экспериментах, порфирина нужно в 20 раз больше. Добавление столь высоких концентраций порфиринов приводит к тому, что комплекс выпадает в осадок. Поэтому определение термодинамических потенциалов комплексообразования (ΔH и ΔS) с помощью уравнения Вант-Гоффа является единственно возможным методом, применимым для исследования энергетики связывания порфиринов с ДНК.

Метод Вант-Гоффа основан на нахождении температурной зависимости константы связывания ТОЕРуР4 с А- и В-ДНК. Для нахождения этой зависимости были проведены эксперименты по титрованию порфиринов с ДНК при четырех температурах 20, 25, 30 и 35°C, при которых ДНК находится в двуспиральном состоянии. Затем из температурной зависимости константы связывания $K_b(T)$ находится энтальпия (ΔH_b) и рассчитывается энтропия (ΔS_b) связывания, используя уравнение Вант-Гоффа.

3.4.1. ТОЕРуР4-ДНК комплексы

На рисунке 21 приведены зависимости логарифма константы связывания $\ln(K_b)$ от обратной температуры ($1/T$) для комплексов ТОЕРуР4/А-ДНК(а) и ТОЕРуР4/В-ДНК(б).

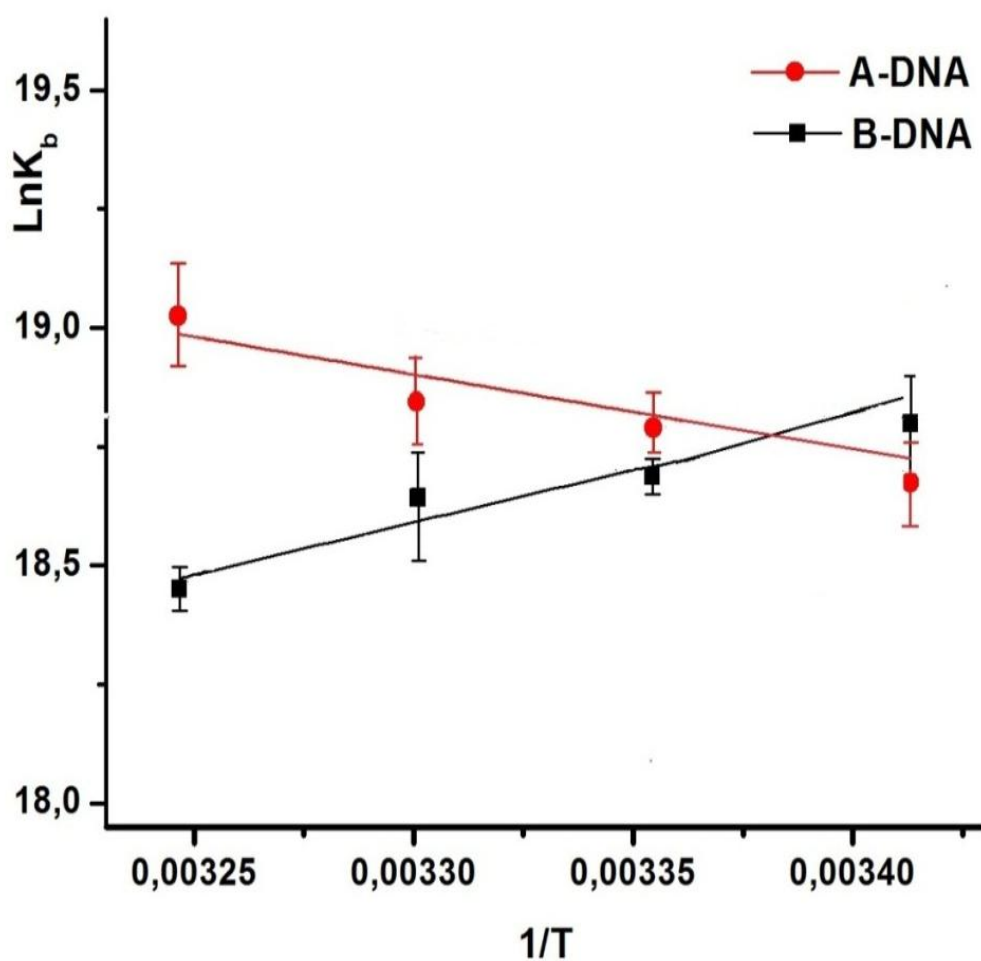


Рис. 21. Зависимость логарифма константы связывания ТОЕРуР4 с А-ДНК и с В-ДНК, от обратной температуры, ионная сила $[\text{Na}^+]=0.001\text{M}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7.1$.

Как видно из рисунка эти зависимости хорошо аппроксимируются линейными функциями, поэтому значения изменения энтальпии связывания, ΔH , можно определить по наклону прямых. Для расчета свободной энергии Гибсса (ΔG) и энтропии связывания (ΔS), используются соотношения (3) из раздела Материалы и методы. Результаты расчетов приведены в таблице 4.

Таблица 4. Термодинамические потенциалы взаимодействия ТОЕРуР4 с разными формами ДНК при $[Na^+]=0.001M$, рН 7.1. Приведены результаты при 25°C.

<i>Порфирин</i>	<i>Формы ДНК</i>	ΔG_b (ккал/моль)	ΔH_b (ккал/моль)	ΔS_b (кал/моль·К)
ТОЕРуР4	А	-11.4±0.1	2.27±0.1	44.8±1.5
	В	-11.1±0.1	-3.85±0.3	22.4±1.3

Как видно из таблицы 4 величина изменения свободных энергий Гибсса (ΔG_b) при связывании ТОЕРуР4 с А- и В-ДНК практически одинакова, но характер изменения энтальпии и энтропии существенно различаются. Связывание ТОЕРуР4 с А-ДНК сопровождается положительным (невыгодным) изменением энтальпии (2.27ккал моль⁻¹), а связывание с В-ДНК сопровождается отрицательным (выгодным) изменением энтальпии (-3.85ккал моль⁻¹). Что касается энтропийной составляющей, то при связывании с обоими формами ДНК она достаточно сильно выражена (выгодная). Значения изменения энтропии при связывании указывают на большой энтропийный вклад в стабилизацию комплекса ТОЕРуР4 с А-ДНК (44.8кал моль⁻¹К⁻¹), и с В-ДНК (22.4 кал моль⁻¹ К⁻¹).

3.4.2. CuТОЕРуР4-ДНК комплексы

На рисунке 22 приведены зависимости логарифма константы связывания $\ln(K_b)$ от обратной температуры ($1/T$) для комплексов CuТОЕРуР4/А-ДНК(а) и CuТОЕРуР4/В-ДНК(б). Зависимости были получены из экспериментов по титрованию порфиринов с ДНК при тех же четырех температурах 20, 25, 30 и 35°C.

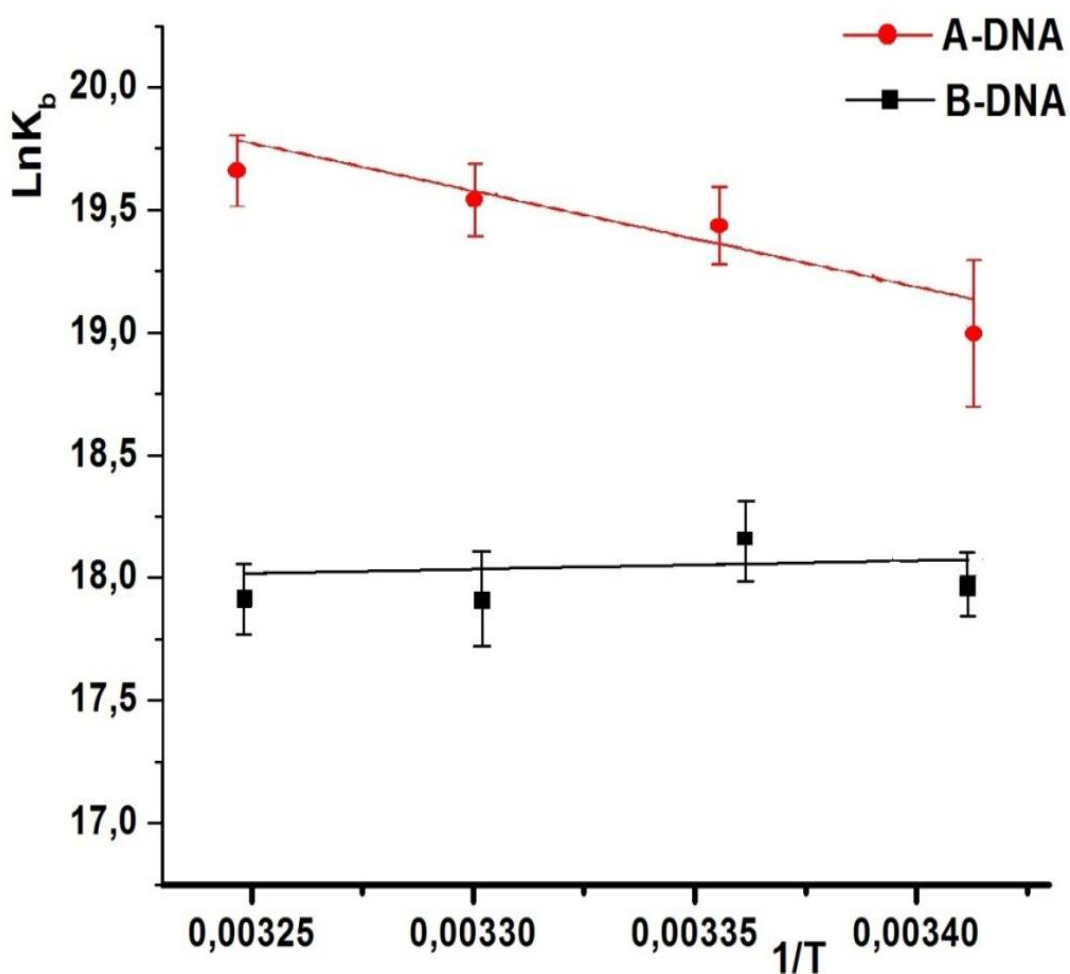


Рис. 22. Зависимость логарифма константы связывания CuТОЕРуР4 с А-ДНК и с В-ДНК, от обратной температуры, ионная сила $[\text{Na}^+]=0.001\text{M}$, 25 °С, рН 7.1.

Из полученных зависимостей были рассчитаны термодинамические потенциалы для каждого из порфирин/ДНК комплексов при 25°C (результаты обобщены в таблице 5).

Таблица 5. Термодинамические потенциалы взаимодействия CuТОЕРуР4 с разными формами ДНК при $[Na^+]=0.001M$, рН 7.1. Приведены результаты при 25 °С.

<i>Порфирин</i>	<i>Формы ДНК</i>	ΔG_b (ккал/моль)	ΔH_b (ккал/моль)	ΔS_b (кал/моль·К)
CuТОЕРуР4	А	-11.71±0.1	10.4±0.5	73.1±1.4
	В	-11.21±0.1	-1.17±0.1	31.1±2.3

Анализ таблицы 5 показывает, что изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_b) при образовании CuТОЕРуР4/А-ДНК и CuТОЕРуР4/В-ДНК комплексов практически одинаково. Из приведенных данных видно, что связывание CuТОЕРуР4 с А-ДНК сопровождается существенным положительным (невыгодным) изменением энтальпии (10.4 ккал моль⁻¹), а связывание с В-ДНК сопровождается небольшим отрицательным (выгодным) изменением энтальпии (-1.17 ккал моль⁻¹). Что касается энтропийного вклада в суммарное изменение свободной энергии Гиббса, то, согласно таблице 5, связывание CuТОЕРуР4 с обоими А- и В-формами ДНК сопровождается существенным положительным (выгодным) изменением энтропии (73.1 ккал моль⁻¹ К⁻¹ и 31.1 ккал моль⁻¹ К⁻¹, для А- и В- форм ДНК, соответственно).

Следовательно, учитывая вышесказанное, можно заключить, что:

- Взаимодействие CuТОЕРуР4 с А-ДНК происходит путем внешнего связывания (положительные изменения энтальпии ΔH_b и энтропии ΔS_b).

- Взаимодействие CuТОЕРуР4 с В-ДНК происходит путем внешнего связывания и методом интеркаляции (при низких концентрациях порфирина).

3.4.3. СоТОЕРуР4-ДНК комплексы

По сравнению с безметальным и Cu-содержащим порфиринами, Со(II)-содержащие порфирины имеют толщину, которая делает невозможным один из механизмов связывания с ДНК - интеркаляцию. В связи с их стерическими особенностями эти порфирины могут взаимодействовать только путем внешнего связывания. Как и для предыдущих случаев для расчета термодинамических потенциалов, характеризующих взаимодействия СоТОЕРуР с А- и В-ДНК мы использовали метод Вант Гоффа.

Были определены константы связывания порфиринов-ДНК комплексов при 20, 25, 30 и 35 °С температурах и построены зависимости Вант-Гоффа для связывания СоТОЕРуР4 с ДНК. На рисунке 23 приведены зависимости логарифма константы связывания $\ln(K_b)$ от обратной температуры ($1/T$) для комплексов СоТОЕРуР4/А-ДНК и СоТОЕРуР4/В-ДНК. Эти экспериментальные зависимости хорошо аппроксимируются линейными функциями, следовательно значения для изменения энтальпии ΔH_b при связывании, можно определить по наклону прямых. Для расчета свободной энергии Гиббса (ΔG_b) и энтропии связывания (ΔS_b), используются известные соотношения, приведенные в разделе Материалы и методы.

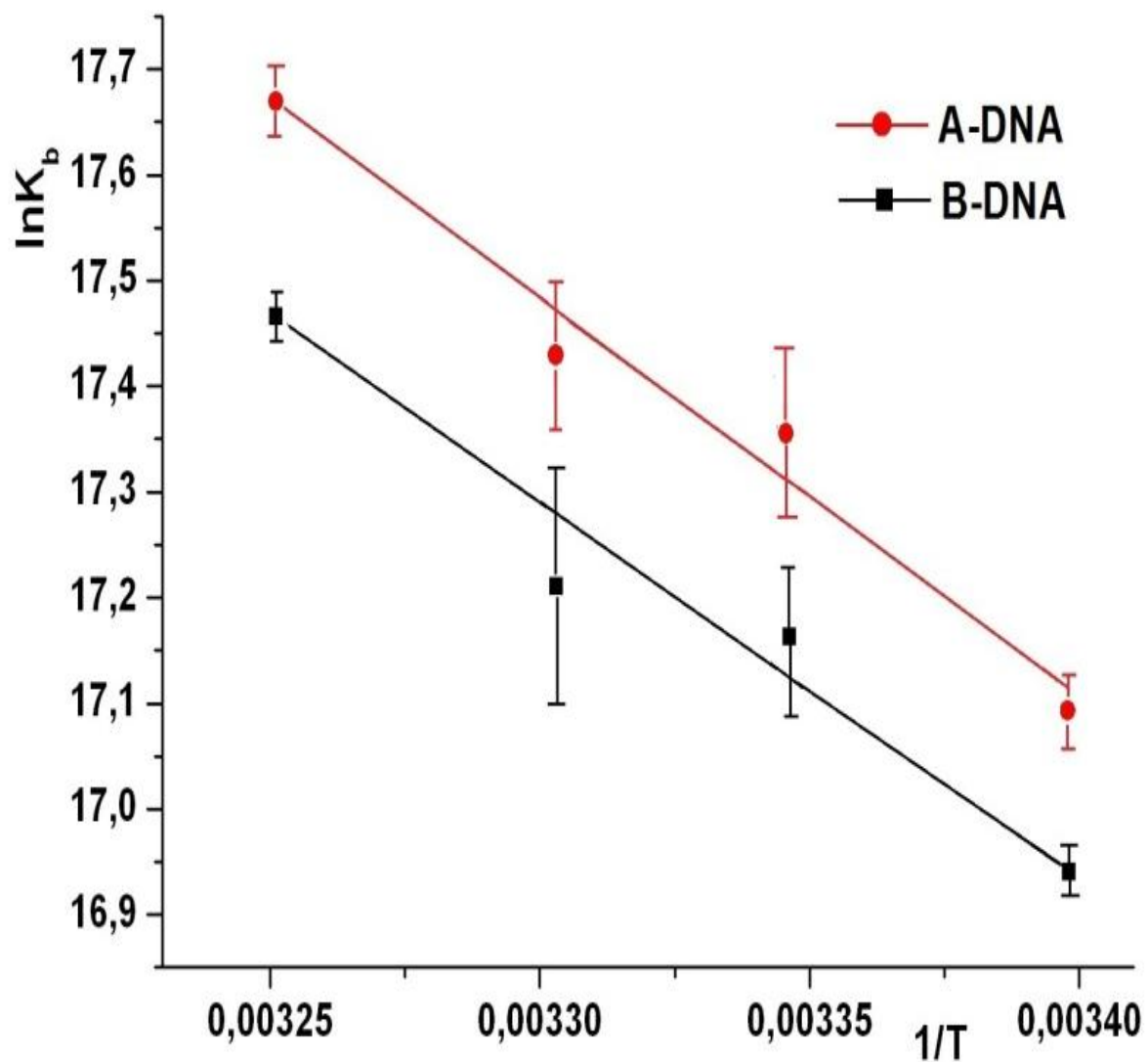


Рис. 23. Зависимость логарифма константы связывания CoTOEPyP4 с А- и В-ДНК, от обратной температуры, ионная сила $[Na^+]=0.001M$, 25 °С, рН 7.1.

В таблице 6 приведены значения изменения термодинамических потенциалов для каждого из комплексов порфирина /ДНК при 25°C.

Таблица 6. Термодинамические потенциалы взаимодействия CoТОЕРуР4 с разными формами ДНК при $[Na^+]=0.001M$, pH 7.1. Приведены результаты при 25°C.

<i>Порфирин</i>	<i>Формы ДНК</i>	ΔG_b (ккал/моль)	ΔH_b (ккал/моль)	ΔS_b (кал/моль·К)
CoТОЕРуР4	А	-10.12±0.1	7.25±0.2	58.7±1.2
	В	-10.34±0.1	7.06±0.1	57.7±1.3

Из данных таблицы 6 видно, что изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_b) при связывании CoТОЕРуР4 с А- и В-ДНК отрицательны и практически одинаковы. Изменения энтальпии, ΔH_b , также имеют одинаковые, но положительные значения, что исключает интеркаляционный способ связывания. А изменения энтропии, ΔS_b , имеют большие положительные (выгодные) значения, что может быть следствием интенсивного вытеснения катионов из бороздок ДНК в раствор при связывании с порфирином [98-100].

Следовательно, по результатам таблицы можно утверждать, что взаимодействие CoТОЕРуР4 с обоими А- и В-формами ДНК имеет выраженный энтропийный характер и происходит путем внешнего связывания.

3.4.4. Сравнительный термодинамический анализ полученных результатов

На рисунке 24 приведена энергетическая диаграмма связывания исследованных порфиринов с А- и В- формами ДНК.

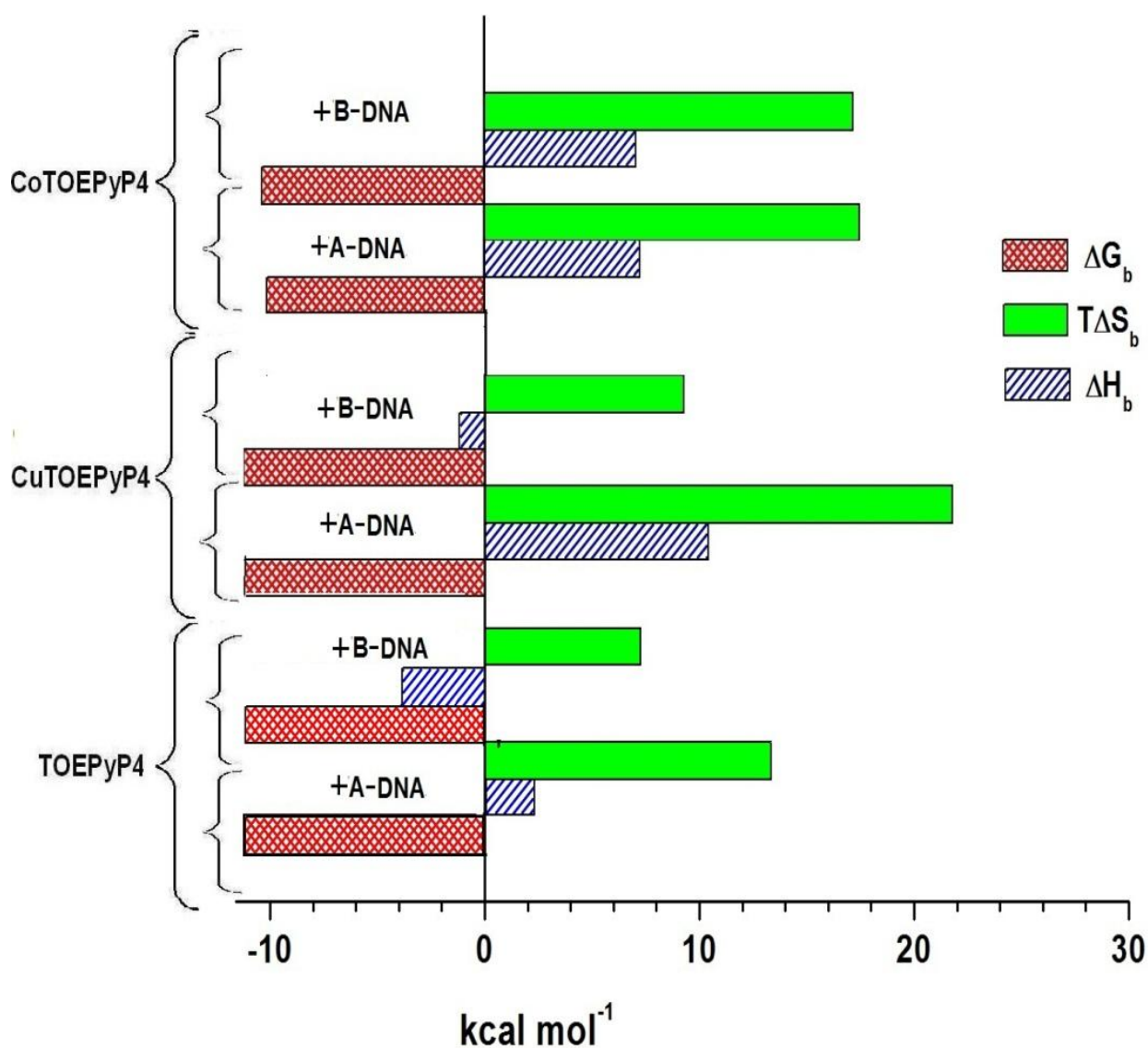


Рис. 24. Диаграмма распределения энергии при комплексобразовании порфиринов с А- и В- формами ДНК.

Как видно из диаграммы суммарное изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_b) практически одинаково (~ 11 ккал/ моль) для связывания всех исследованных порфиринов и не зависит от формы спирали ДНК (А или В). Но энтропийная (ΔS_b) и энтальпийная (ΔH_b) составляющие свободной энергии (ΔG_b) сильно отличаются. Для В-формы ДНК интеркаляторы (ТОЕРуР4 и CuТОЕРуР4) имеют благоприятные отрицательные значения энтальпии ΔH_b , а для связывающегося внешнего порфирина (CoТОЕРуР4) характерны невыгодные положительные значения ΔH_b и выгодные очень большие значения ΔS_b . Для А-формы ДНК характерны положительные (невыгодные) значения энтальпии ΔH_b и большие выгодные значения энтропии ΔS_b .

Объяснение следующее: При интеркаляции увеличивается суммарная отрицательная энергия (энтальпия) комплекса за счет создания дополнительных стэкинг взаимодействий между интеркалированным порфирином и соседними парами азотистых оснований ДНК. Поэтому для механизма интеркаляции характерно отрицательное (выгодное) изменение энтальпии, ΔH_b . При внешнем связывании положительно заряженные порфирины выталкивают в раствор с поверхности ДНК часть положительно заряженных ионов натрия и гидратированных молекул воды, которые, приобретая свободу, увеличивают суммарную энтропию системы. Следовательно, увеличение энтропии, ΔS_b , системы при связывании порфирина с ДНК – признак внешнего связывания. Иначе говоря, интеркаляция характеризуется отрицательными ΔH_b и относительно малыми ΔS_b , а внешнее связывание - положительными ΔH_b и относительно большими ΔS_b .

Таким образом, согласно приведенной диаграмме, наблюдается корреляция между значениями термодинамических потенциалов (ΔS_b и ΔH_b) и механизмом связывания порфиринов с ДНК. Следовательно, исследуя энергетику комплексообразования, можно сделать вывод о механизме связывания порфиринов с ДНК.

Выводы:

- На основании спектральных исследований впервые проведен полный термодинамический анализ связывания ТОЕРуР4, CuТОЕРуР4 и СоТОЕРуР4 с А-формой ДНК. Для всех соединений получены значения ΔG , ΔH , ΔS .
- Показано, что для всех порфиринов изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_b) при связывании с А- и В-формами ДНК имеет практически одинаковое значение (~ 11 ккал/моль).
- Показано, что существует корреляция между изменением термодинамических потенциалов и способом связывания порфиринов: отрицательное значение энтальпии связывания (ΔH_b) характеризуют интеркаляционный способ связывания, в то время как положительные ΔH_b и большие значения ΔS_b характеризуют внешнее связывание.
- Показано, что с А-ДНК все порфирины предпочитают связываться только внешне.

Глава 4. Влияние ионной силы на комплексообразование порфиринов-ДНК.

Как уже было сказано в литобзоре способ взаимодействия катионических порфиринов с ДНК сильно зависит от структуры порфиринов: от типа центрального металла, от месторасположения бокового радикала на пиридиловом кольце порфиринов, а также от конформации ДНК и условий окружающей среды [2,6,7,11,101]. В свою очередь конформация ДНК зависит от ионной силы и температуры. Влияние ионной силы на степень связывания указывает на участие электростатических сил в связывании. Из литературы известно, что при фиксированной концентрации порфирина НТМРуР4 и ДНК, порфирин имеет тенденцию интеркалировать при низких концентрациях соли (что проявляется в виде отрицательного ИКД спектра при 446нм), но при добавлении соли (когда экранирование зарядов сильнее), внешнее связывание становится более предпочтительным и сопровождается появлением положительной полосы на ИКД спектрах [47,102].

Эти данные о механизмах связывания, а также значения параметров связывания порфиринов с В-ДНК были получены при достаточно высоких ионных условиях $0.02\text{M} < [\text{Na}^+] < 0.2\text{M}$. Однако, полученные нами в главе 3 настоящей диссертации результаты по связыванию порфиринов с А-формой ДНК, были получены при $[\text{Na}^+] = 0.001\text{M}$, поскольку А-форма ДНК может реализоваться только в условиях низких ионных сил. И соответственно, сравнение полученных результатов с В-ДНК проводилось в аналогичных условиях низких ионных сил. В настоящей главе мы поставили целью исследовать как меняется тип связывания и параметры связывания порфиринов с ДНК с изменением ионных условий ($0.001\text{M} < [\text{Na}^+] < 0.2\text{M}$). Естественно, исследования при более высоких ионных силах проводились только для В-формы ДНК.

4.1. Влияние ионной силы на ТОЕРуР4-ДНК взаимодействие.

Термодинамика связывания ТОЕРуР4с ДНК при разных ионных силах.

На рисунке 25 приведены спектры поглощения ТОЕРуР4/В-ДНК при $[\text{Na}^+]=0.02\text{M}$ (а) и $[\text{Na}^+]=0.2\text{M}$ (б), 25 °С.

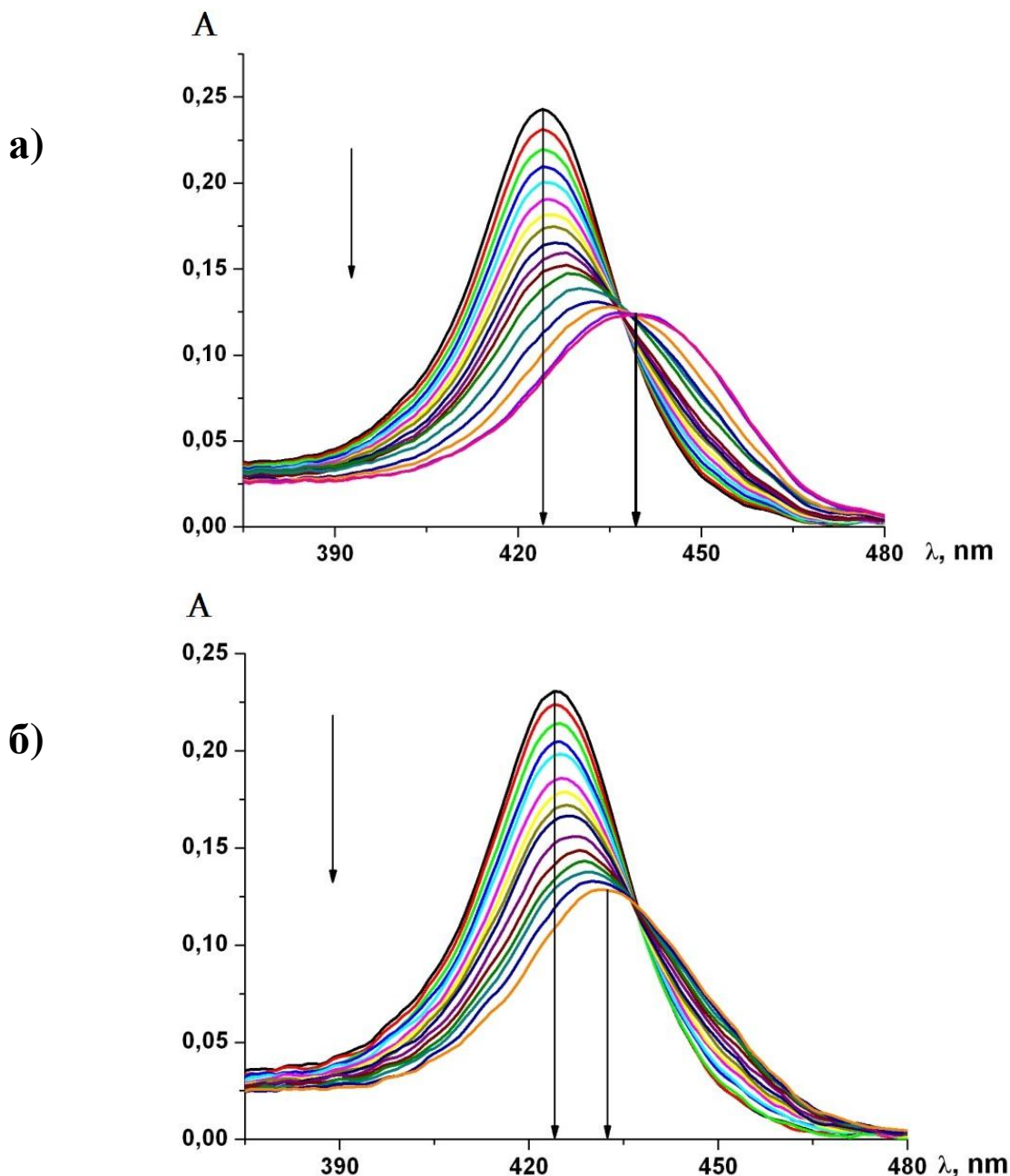


Рис.25. Спектры поглощения ТОЕРуР4/В-ДНК при $[\text{Na}^+]=0.02\text{M}$ (а) и $[\text{Na}^+]=0.2\text{M}$ (б), 25 °С, рН 7.1. Концентрация порфирина - 10^{-6} М. Концентрация добавляемого маточного раствора В-ДНК $\sim 1.5 \cdot 10^{-4}$ М пар оснований/ mL .

Связывание порфиринов с ДНК, как правило, сопровождается красным смещением и гипохромизмом в области поглощения порфирина. Как видно из рис.25(а,б) добавление ДНК к раствору порфирина ТОЕРуР4 приводит к красному сдвигу($\Delta\lambda$) максимума полосы поглощения Core на 13 нм и 8нм и его гипохромизму на ~ 49.5%, ~ 44.4%, при $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б) ионной силе, соответственно. Характерной особенностью данных спектров является наличие изобестической точки при низких концентрациях добавляемой ДНК, которая свидетельствует о наличии одного механизма связывания.

Используя данные оптического поглощения (по данным рисунка 25) были построены изотермы связывания для ТОЕРуР4/В-ДНК комплекса при $[Na^+]=0.02M$ и $[Na^+]=0.2M$ ионных силах. Для расчета параметров связывания ТОЕРуР4 с В-ДНК использовалось уравнение (2), предложенное Коррея и Чарсом (раздел Материалы и методы). В таблице 7 приведены рассчитанные параметры связывания ТОЕРуР4 с В-ДНК при ионных силах $[Na^+]=0.02M$ и $[Na^+]=0.2M$. Для сравнения приводятся полученные нами в гл.3 значения при $[Na^+]=0.001M$.

Таблица 7. Параметры связывания ТОЕРуР4 с В-ДНК при разных ионных силах, 25 °С, рН 7.1.

Комплекс	$[Na^+], M$	$K_b \cdot 10^7 M^{-1}$	n
ТОЕРуР4/В-ДНК	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

Как видно из Таблицы 7, при взаимодействии ТОЕРуР4 с В-ДНК увеличение ионной силы приводит к уменьшению константы связывания. Следовательно, можем сделать вывод, что ТОЕРуР4 сильнее взаимодействует с В-ДНК при $[Na^+]=0.001M$.

Спектры КД ТОЕРуР4-ДНК комплексов.

Как видно из рис. 25(а, б) характер изменения спектров поглощения ТОЕРуР4/В-ДНК комплекса с увеличением концентрации ДНК при разных ионных условиях практически не отличается друг от друга, и по полученным данным невозможно определить предпочтительный механизм взаимодействия. Поэтому для установления механизмов взаимодействия нами были также получены и проанализированы спектры кругового дихроизма (КД) комплексов при ионных силах $[Na^+]=0.02M$ и $[Na^+]=0.2M$.

На рисунке 26 приведены спектры кругового дихроизма ТОЕРуР4/В-ДНК комплекса при различных ионных силах $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б). Как видно из рис.26(а) при $[Na^+]=0.02M$ увеличение концентрации ТОЕРуР4 приводит к появлению отрицательного и положительного полос ИКД спектра на полосе 400-470нм. При дальнейшем увеличении относительной концентрации форма индуцированной полосы ТОЕРуР4/В-ДНК комплекса не меняется, только интенсивность положительной полосы КД спектра начинает превышать интенсивность отрицательной полосы. Как видно из рис.26(б) при ионной силе $[Na^+]=0.2M$ увеличение концентрации порфирина приводит к появлению положительной полосы ИКД спектра. Увеличение относительной концентрации приводит к появлению небольшой отрицательной полосы ИКД спектра, тогда как, интенсивность положительной полосы ТОЕРуР4/В-ДНК комплекса растет. Анализ изменения формы спектров ИКД позволяет заключить, что при высоких ионных силах ($[Na^+]=0.2M$) доминирует внешнее связывание ТОЕРуР4 с В-ДНК.

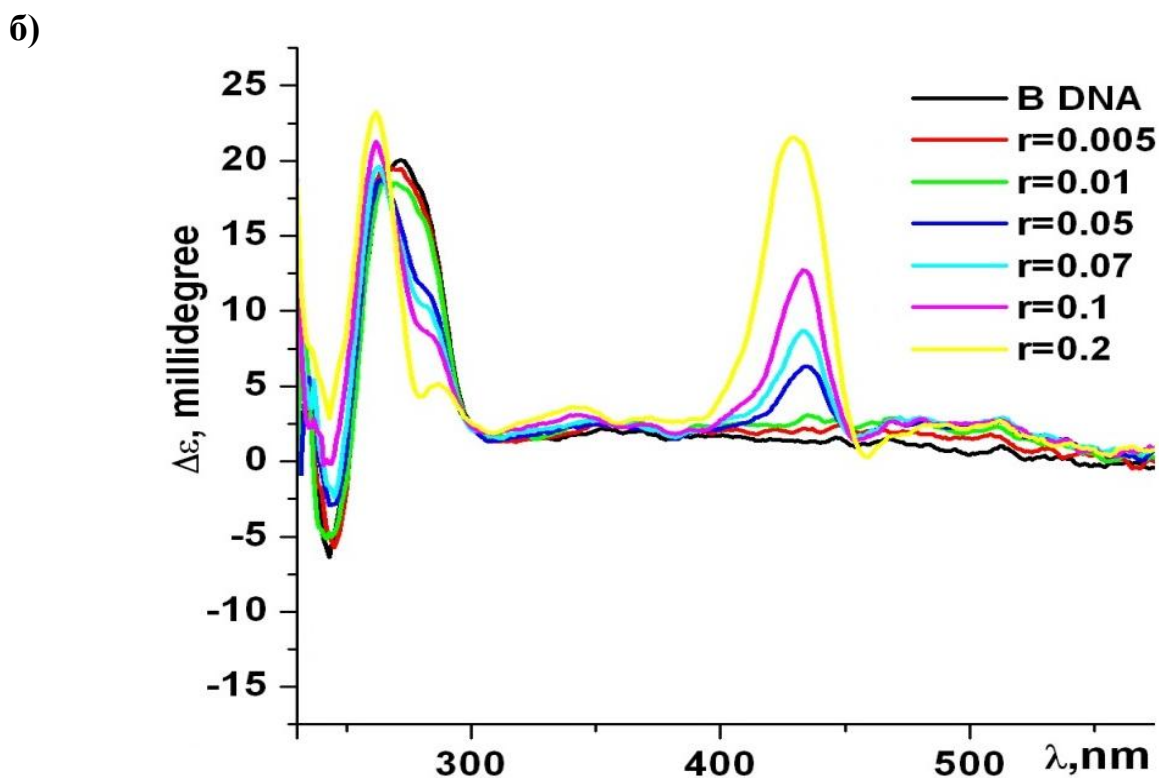
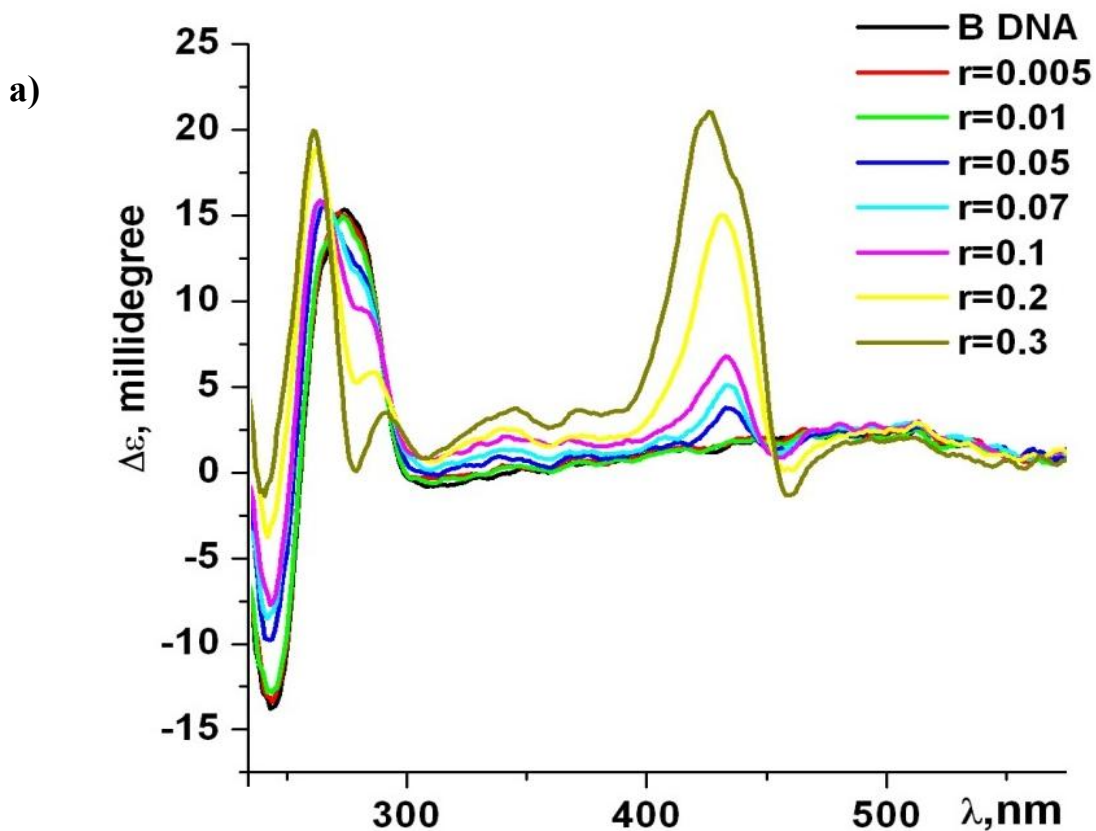


Рис. 26. Спектры кругового дихроизма ТОЕРуР4/В-ДНК при $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б), 25 °С, рН 7.1. Концентрации растворов В- ДНК в эксперименте одинаковы и равны $\sim 7.5 \cdot 10^{-5}M$ пар оснований/ mL . Относительная концентрация добавляемого порфирина (r) указана на рисунках.

4.2 Влияние ионной силы на комплексообразование

Си- и Со - металлопорфиринов с ДНК

Спектры поглощения комплексов при различных ионных силах.

На рисунках 27 и 28 приведены изменения спектров поглощения CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов при ионных силах $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б). Отметим, что эти металлопорфирины отличаются от исследованных в предыдущей главе, типом бокового радикала. Как показывают проведенные в нашей лаборатории исследования тип бокового радикала практически не влияет на характер их взаимодействия с В-ДНК [101-105].

Из рисунка 27 видно, что взаимодействие CuTButPyP4 приводит к красному сдвигу($\Delta\lambda$) максимума полосы поглощения Core на 5 нм и 3 нм и к его гипохромизму на $\sim 44\%$, $\sim 32.1\%$, при ионных силах $[Na^+]= 0.02M$ рис.27(а) и $[Na^+]= 0.2M$ рис.27(б), соответственно.

Взаимодействие CoTButPyP4 с ДНК (рис.28) также приводит к красному сдвигу ($\Delta\lambda$) максимуму полосы поглощения Core на 5 нм и 4 нм и к его гипохромизму на $\sim 30.1\%$, $\sim 29.3\%$, при $[Na^+] = 0.02M$ рис.30(а) и $[Na^+] = 0.2M$ рис.30(б) ионных силах, соответственно. Используя данные оптического поглощения (по данным рисунков 27 и 28) были построены изотермы связывания для концентраций, при которых наблюдается изобестическая точка для CuTButPyP4/В-ДНК и CoTButPyP4/В-ДНК при $[Na^+]=0.02M$ и $[Na^+]=0.2M$.

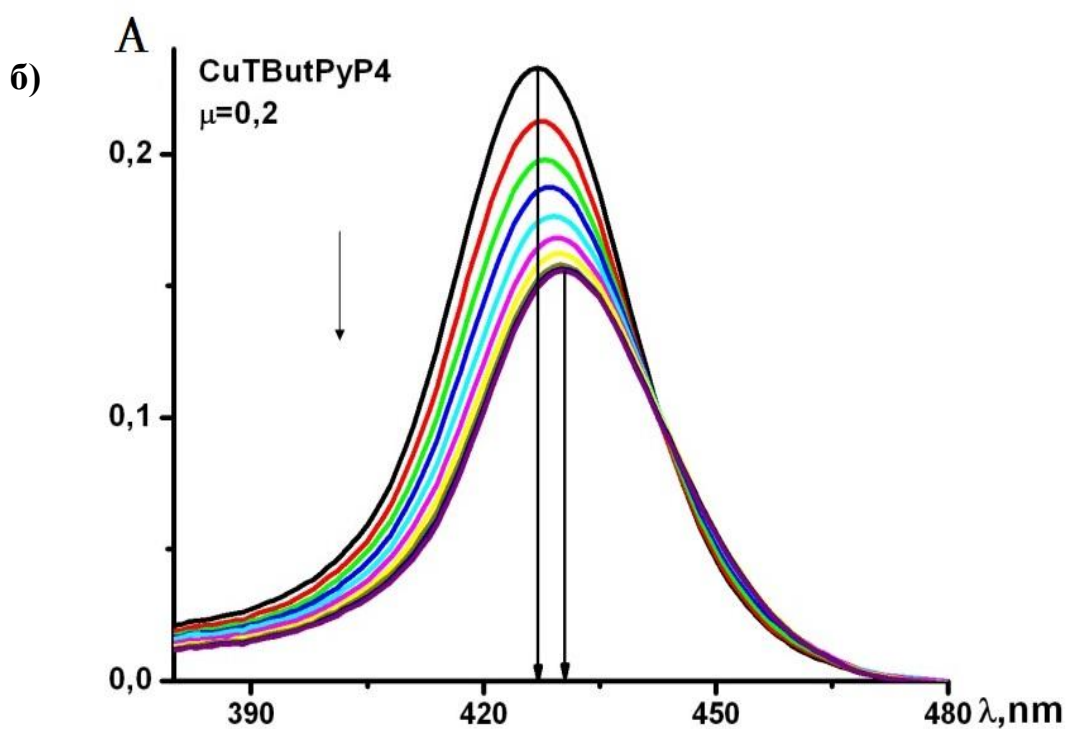
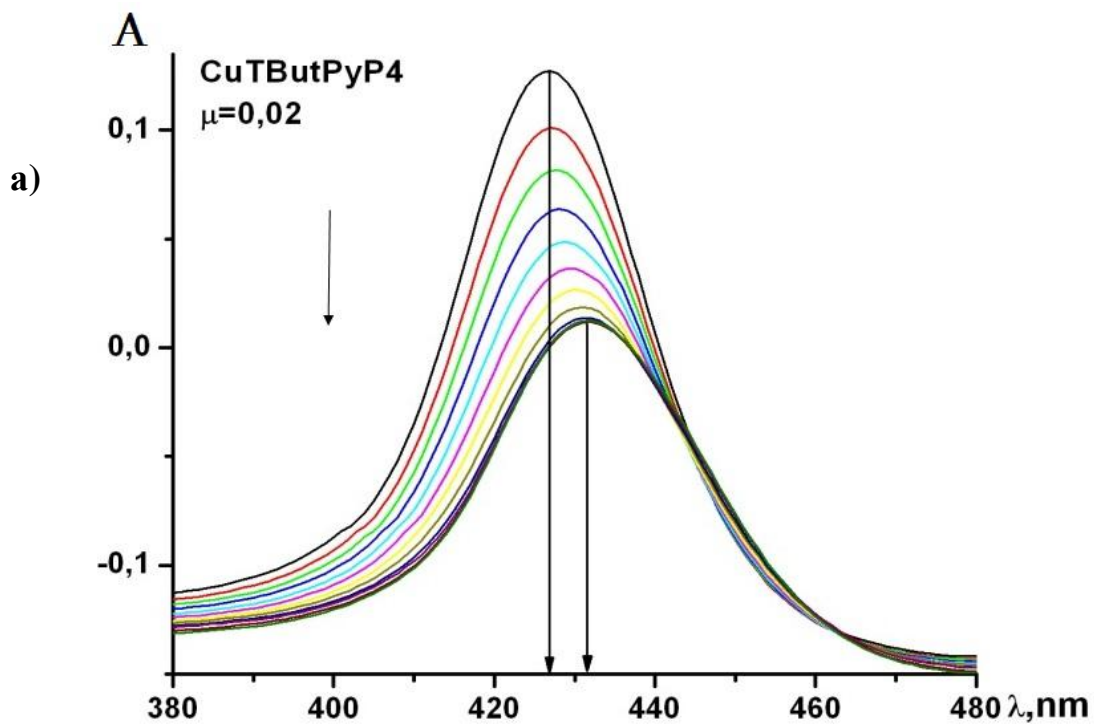


Рис. 27. Спектры поглощения CuTButPyP4/В-ДНК, при $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б), 25 °С, рН 7.1. Концентрация раствора порфирина $10^{-6} M$. Концентрация добавляемого маточного раствора В-ДНК $\sim 1.4 \cdot 10^{-4} M$ пар оснований/ mL .

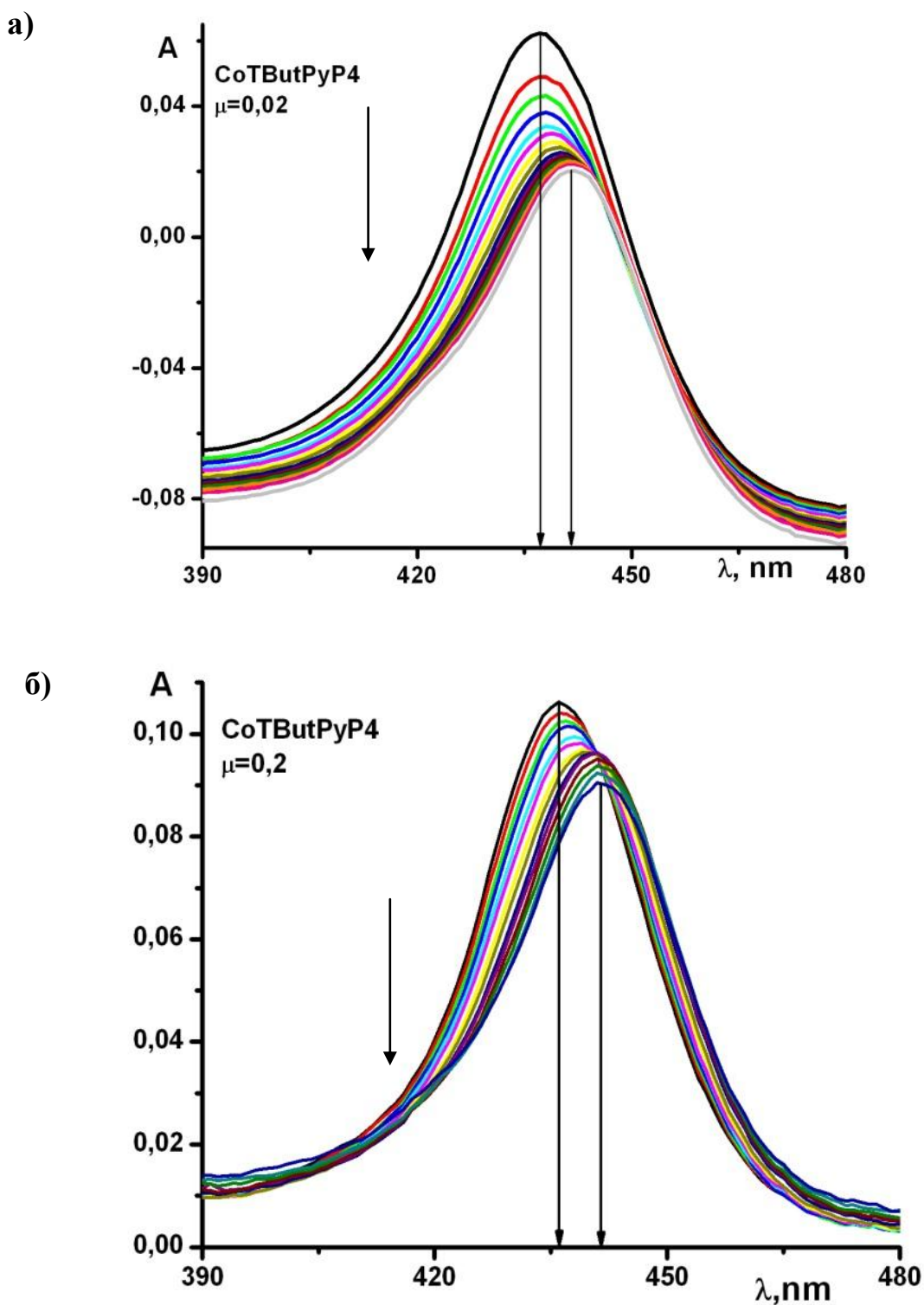


Рис. 28. Спектры поглощения CoTButPyP4/В-ДНК, при $[\text{Na}^+] = 0.02 \text{ M}$ (а) и $[\text{Na}^+] = 0.2 \text{ M}$ (б), 25°C , $\text{pH } 7.1$. Концентрация раствора порфирина 10^{-6} M . Концентрация добавляемого маточного раствора В-ДНК $\sim 1.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ пар оснований/ mL .

В таблице 8 приведены параметры связывания для CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов при различных ионных силах. Для сравнения приводятся полученные нами в гл.3 значения при $[Na^+]=0.001M$.

Таблица 8. Параметры связывания CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов при разных ионных силах, 25 °С, рН 7.1

Порфирин	[Na⁺], М	$K_b \cdot 10^7 M^{-1}$	n
CuTOEPyP4	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
CoTOEPyP4	0.001	3.8±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 8 константа связывания с В-ДНК Cu-содержащих порфиринов более, чем в 20 раз больше константы связывания Co-содержащих при всех ионных силах. Кроме того как видно из таблицы, увеличение ионной силы приводит к уменьшению K_b и увеличению n для обоих металлопорфиринов.

Можно заключить, что увеличение ионной силы приводит к ослаблению интеркаляционного способа связывания и усилению внешнего связывания порфиринов с В-ДНК.

Спектры ИКД комплексов при различных ионных силах

Для установления предпочтительного механизма связывания порфиринов с В-ДНК были получены и проанализированы спектры кругового дихроизма (КД).

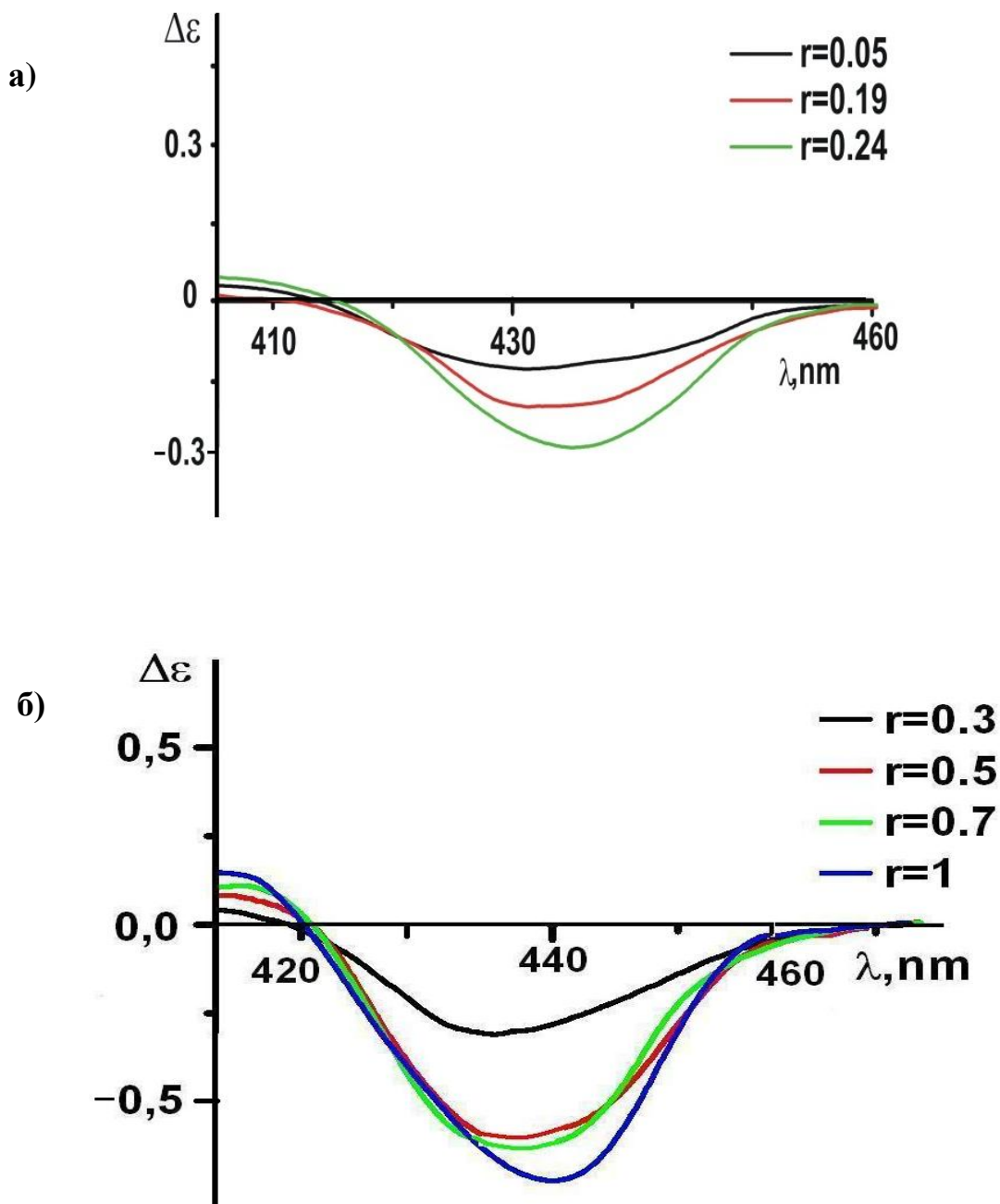
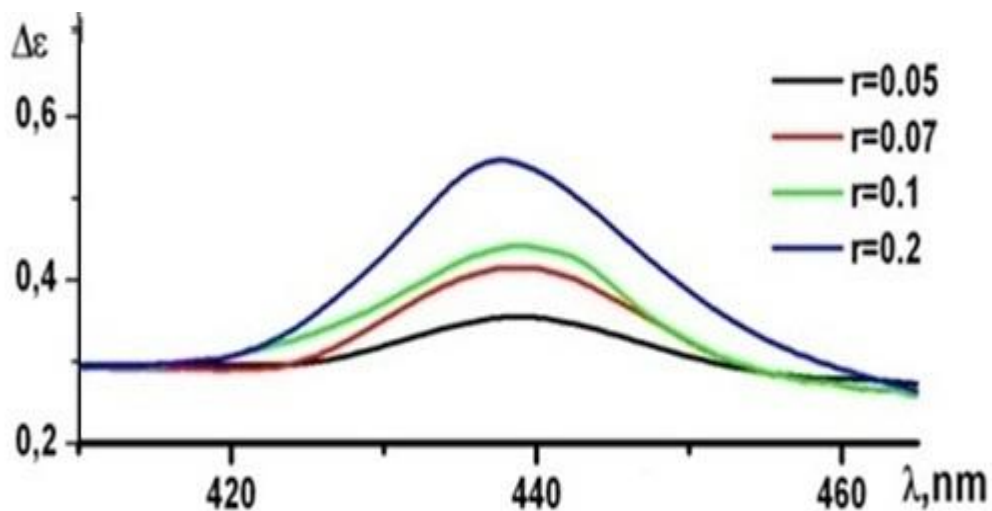


Рис. 29. Спектры кругового дихроизма CuTButPyP4/В-ДНК при $[\text{Na}^+] = 0.02\text{M}$ (а) и $[\text{Na}^+] = 0.2\text{M}$ (б), 25 °С, рН 7.1. Концентрация В-ДНК $\sim 7.5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ пар оснований/ mL .

а)



б)

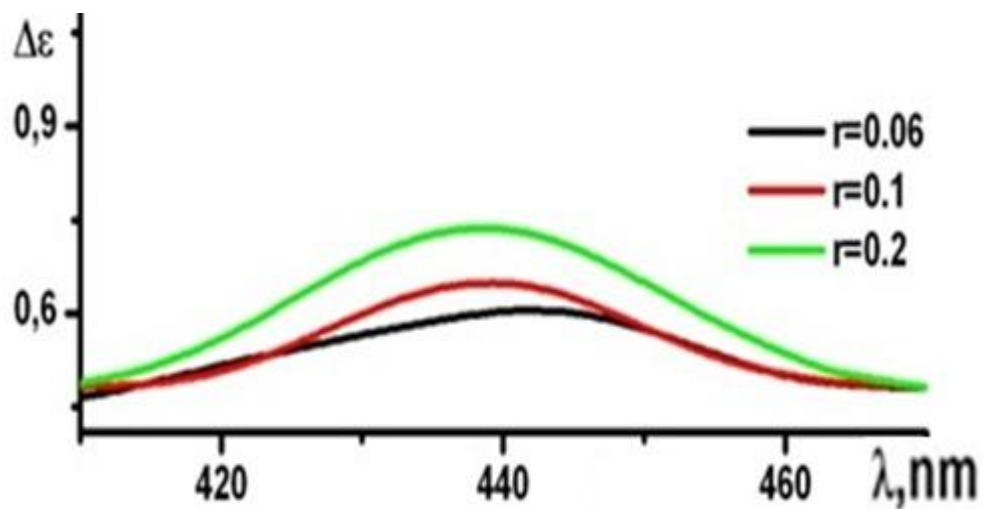


Рис. 30. Спектры кругового дихроизма CoTButPyP4/B-ДНК при $[Na^+] = 0.02 M$ (а) и $[Na^+] = 0.2 M$ (б), $25^\circ C$, pH 7.1. Концентрация В- ДНК $\sim 7.7 \cdot 10^{-5} M$ пар оснований/mL.

На рисунках 29 и 30 приведены спектры индуцированного кругового дихроизма CuTButPyP4/В-ДНК и CoTButPyP4/В-ДНК комплексов при ионных силах $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б), соответственно.

Как видно из рис.29(а) при $[Na^+]=0.02M$ увеличение относительной концентрации порфирина ($0.05 < r < 0.3$) в CuTButPyP4/В-ДНК комплексе приводит к появлению отрицательного ИКД спектра на полосе 400-470нм. А при $[Na^+]=0.2M$ (рис.29(б)) увеличение концентрации порфирина также приводит к появлению отрицательной полосы ИКД спектра при $0.3 < r < 1$ относительных концентрациях. Анализ ИКД спектров комплекса показывает, что при низких ионных условиях комплекс достигает насыщения при существенно более низких концентрациях порфирина ($r=0.24$), чем при высоких ($r=0.7$). Этот результат может свидетельствовать о том, что при высоких ионных силах появляются дополнительные места (скорее всего в желобках) связывания порфиринов на ДНК. Полученные данные указывают на то, что Cu-содержащий порфирин взаимодействует с ДНК преимущественно путем интеркаляции, но с увеличением ионной силы наблюдается сдвиг равновесия в сторону внешнего связывания.

По сравнению с CuTButPyP4 при взаимодействии CoTButPyP4 с ДНК на спектрах ИКД, наблюдается только положительная полоса (рис.30(а и б)). Нужно заметить, что увеличение относительной концентрации CoTButPyP4 больше $r = 0.2$ приводит к агрегации ДНК. (Для сравнения, CuTButPyP4/ДНК комплекс агрегирует при $r = 1$). Из рис.30 видно, что при $[Na^+]=0.02M$ (а) и $[Na^+]=0.2M$ (б) с увеличением концентрации CoTButPyP4 в растворе ДНК наблюдается рост положительной полосы ИКД, т.е. характер связывания Co-порфирина с ДНК практически не меняется с изменением ионной силы. Подобный характер изменения спектров ИКД свидетельствует о том, что Co-металлопорфирин предпочитает только внешнее связывание.

Вывод. Увеличение концентрации $[Na^+]$ приводит к ослаблению интеркаляционного способа связывания и усилению внешнего связывания

плоских ТОЕРуР4 и Cu-содержащих порфиринов с В-ДНК, а для имеющего аксиальный лиганд Со-порфирина характер связывания с В-ДНК (внешнее связывание) слабо зависит от ионной силы.

4.3 Влияние двухвалентных ионов Mn^{2+} на термостабильность ДНК-порфирин комплексов

Из литературы известно, что избирательное комплексообразование ионов переходных металлов с GC-богатыми участками ДНК приводит к локальным изменениям структуры GC-богатых областей нативной ДНК. С другой стороны при относительно низких стехиометрических концентрациях ионов переходных металлов ДНК при комнатной температуре переходит в более закрученную по сравнению с В-формой “С-подобную” форму [106,107]. Наблюдаемый переход в присутствии этих ионов (например, исследованных в настоящей работе ионов Mn^{2+}) обусловлен дополнительной экранировкой отрицательно заряженных фосфатных групп положительно заряженными двухвалентными ионами. Эффект достигает насыщения при условии, когда на 2 фосфатные группы ДНК приходится 1 ион Mn^{2+} ($\nu=0.5M/P$, где $\nu = C_{Mn^{2+}}/C_{\text{нуклеотидов ДНК}}$), при этом один двухвалентный ион как скрепка связывает две соседние фосфатные группы друг с другом.

Переход в сторону С – формы ДНК можно осуществить также увеличивая концентрацию ионов натрия в растворе. Однако, механизмы взаимодействия одновалентных и двухвалентных ионов с ДНК существенно различаются. Одновалентные ионы взаимодействуют с ДНК в виде ионной шубы, окружая как фосфатные группы, так и заполняя желобки ДНК. Соответственно, для получения одной и той же С-подобной формы ДНК нужно взять NaCl существенно больше, чем $MnCl_2$. Но самая главная особенность заключается в

следующем, получение С-подобной формы с помощью двухвалентных ионов оставляет желобки ДНК относительно свободными (в них имеются столько ионов натрия, сколько вводится вместе с буфером).

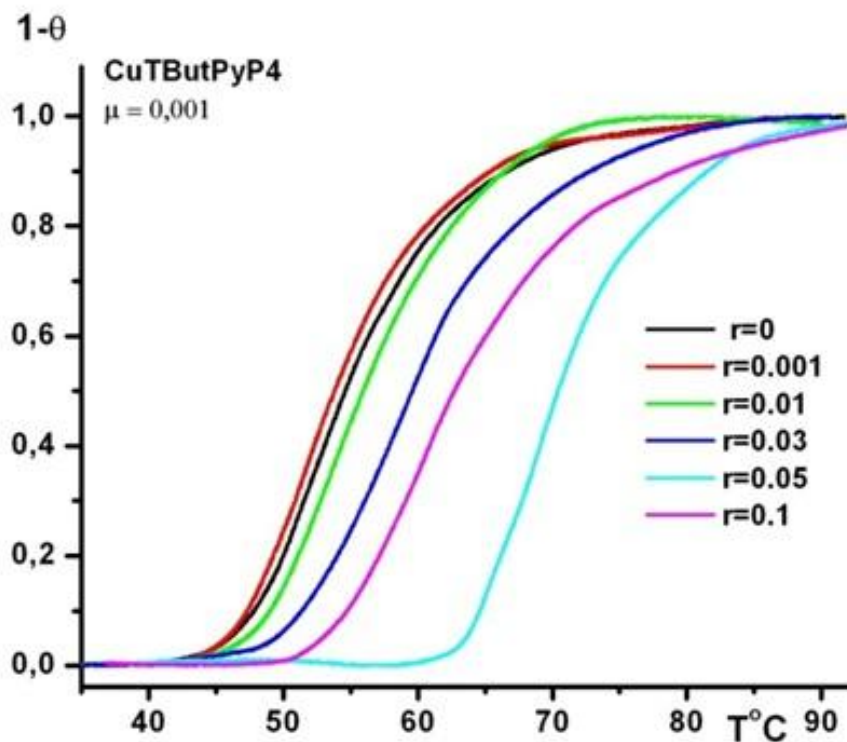
В условиях относительной концентрации ионов Mn^{2+} $v=0.5$ фосфатные группы ДНК полностью экранированы, что означает, что места для внешнего связывания порфиринов заблокированы. А желобки ДНК остаются свободными, что создает благоприятные условия для их интеркаляции. В этих условиях мы исследовали плавление комплексов ДНК с двумя порфиринами, которые по-разному связываются с ДНК ($CuTButPyP4$ связывается посредством интеркаляции и $CoTButPyP4$, для которого характерно внешнее связывание).

На рисунке 31 приведены кривые плавления $CuTButPyP4/ДНК$ и $CoTButPyP4/ДНК$ комплексов при ионной силе $[Na^+]=0.001M$ без ионов Mn^{2+} . Концентрация порфиринов варьировалась в интервале $0,001 < r < 0,1$, поскольку при более высоких концентрациях ($r > 0.1$) наблюдающиеся агрегационные явления не позволяют получить достоверную кривую плавления.

Как видно из рис.31(а и б), общая форма кривой плавления существенно меняется при взаимодействии с $CuTButPyP4$ и $CoTButPyP4$ порфиринами. Кроме сдвига в высокотемпературную область, с увеличением относительной концентрации порфиринов наблюдается также изменение формы кривых плавления: конец кривой плавления сильно сдвигается в сторону высоких температур, что позволяет предположить, что взаимодействие ДНК с Cu - и Co -содержащими порфиринами приводит к селективной стабилизации GC-богатых участков ДНК.

В таблице 9 приведены параметры плавления $CuTButPyP4/ДНК$ и $CoTButPyP4/ДНК$ комплексов при различных относительных концентрациях порфиринов. Анализ таблицы показывает, что в присутствии Cu - и Co -порфиринов температура плавления (T_m) увеличивается почти на 15° при концентрации $r=0.1$.

а)



б)

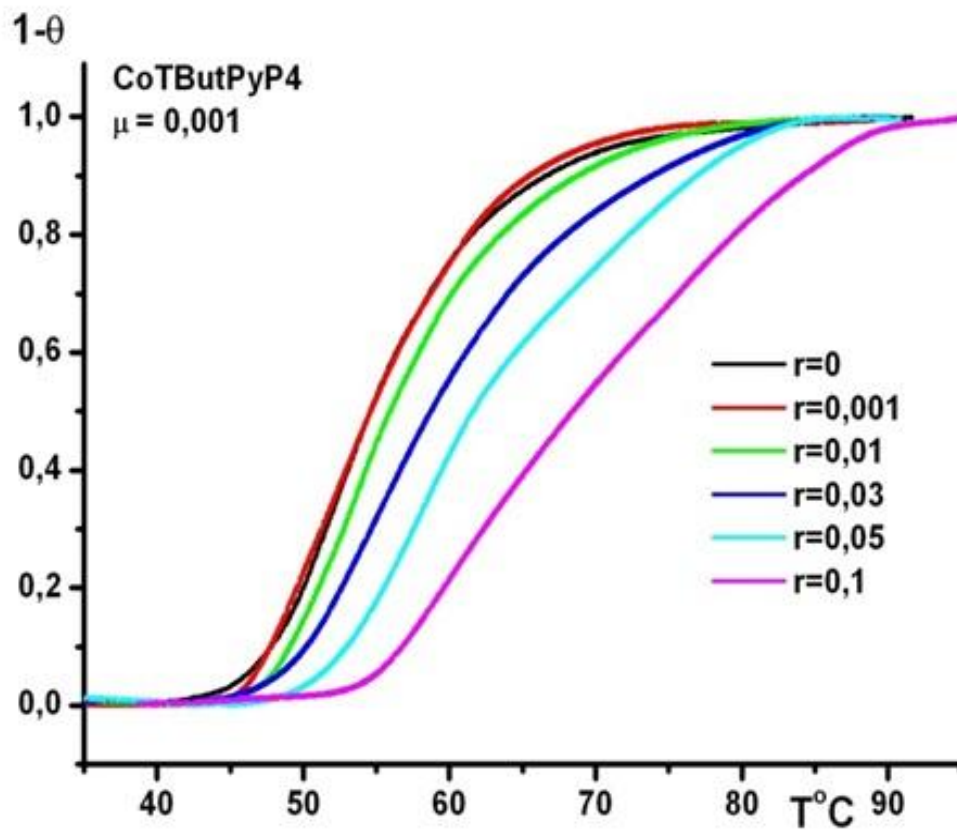


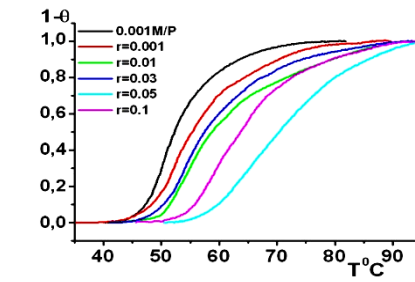
Рис. 31. Кривые плавления CuTButPyP4/ДНК(а) и CoTButPyP4/ДНК(б) комплексов при $[\text{Na}^+]=0.001\text{M}$, pH 7.1.

Таблица 9. Температура плавления (T_m), интервал плавления (ΔT) ДНК в присутствии различных концентраций Cu-/Co-порфиринов при $[Na^+]=0.001M$, pH 7.1.

r [P]/[DNA]	CuButPyP4/DNA		CoButPyP4/DNA	
	T_m	ΔT	T_m	ΔT
0	54.6	13.2	54.6	13.2
0.001	53.8	13.01	54.53	13.38
0.01	55.9	13.0	56.06	14.5
0.03	59.6	15.34	58.86	17.58
0.05	62.65	12.65	61.68	18.85
0.1	70.4	15.85	68.35	21.9

Рассмотрим как же изменяются (и изменяются ли) кривые плавления этих же порфирин-ДНК комплексов в $10^{-3}M$ NaCl в присутствии ионов Mn^{2+} . На рисунке 32 приведены кривые плавления CuTButPyP4/ДНК (а) и CoTButPyP4/ДНК (б) комплексов в присутствии различных относительных концентраций ионов Mn^{2+} (ν изменяется от 0 до 1). Как видно из рис.32 (а и б), увеличение концентрации ионов Mn^{2+} до $\nu=0.5$ приводит к сильной стабилизации двойной спирали ДНК при комплексообразовании с CuTButPyP4 и CoTButPyP4. Дальнейшее увеличение концентрации ионов марганца приводит к уменьшению температуры плавления комплекса. Это обусловлено тем, что при этих концентрациях ионы марганца связываются с гуаниновыми основаниями, что приводит к дестабилизации двойной спирали ДНК [32]. Из рисунка также видно, что с увеличением концентрации порфирина существенно изменяется конец кривых плавления, соответствующий выплавлению GC-богатых участков ДНК.

a)



b)

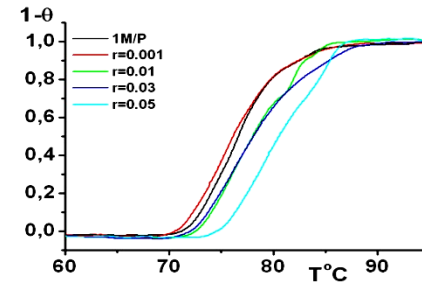
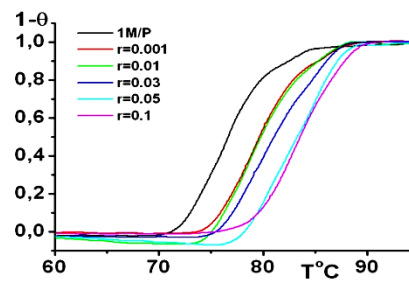
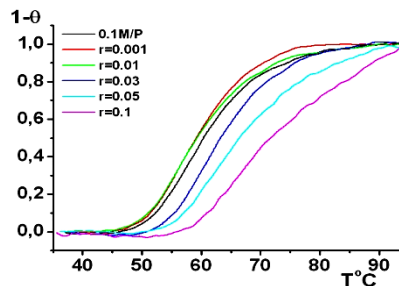
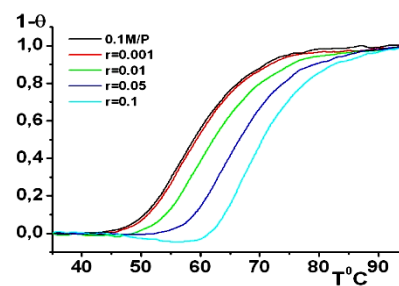
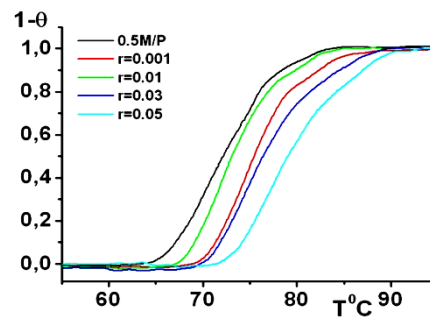
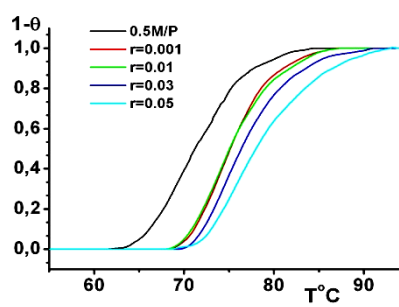
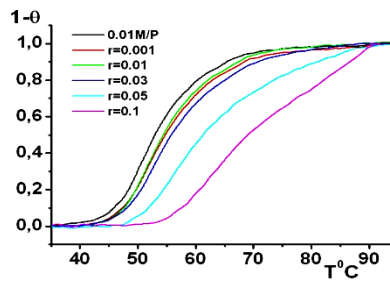
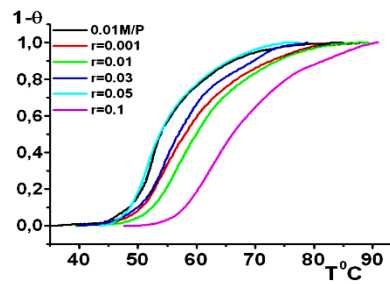
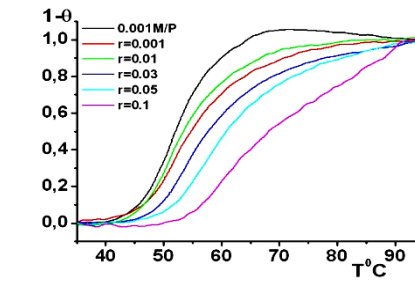


Рис. 32. Кривые плавления CuTButPyP4/ДНК(а) и CoTButPyP4/ДНК(б) комплексов в присутствии ионов Mn^{2+} , $[Na^+]=0.001M$, pH 7.1.

Как видно из рис.32 (а и б), увеличение концентрации ионов Mn^{2+} до $\nu=0.5$ приводит к сильной стабилизации двойной спирали ДНК при комплексообразовании с CuTButPyP4 и CoTButPyP4. Дальнейшее увеличение концентрации ионов марганца приводит к уменьшению температуры плавления комплекса. Это обусловлено тем, что при этих концентрациях ионы марганца связываются с гуаниновыми основаниями, что приводит к дестабилизации двойной спирали ДНК [32].

Из рисунка рис.32 (а и б) также видно, что с увеличением концентрации порфирина существенно изменяется конец кривых плавления, соответствующий выплавлению GC-богатых участков ДНК. Из литературы мы знаем, что интеркаляция происходит именно в GC-богатых участках ДНК и для предпочитающего интеркаляцию CuTButPyP4 такой характер изменения кривой плавления вполне естественный и подтверждает интеркаляционный характер связывания с ДНК. Но как видно из рис.32(б) основные изменения кривых плавления CoTButPyP4/ДНК комплексов также происходят в высокотемпературном интервале (в GC-участках ДНК), что свидетельствует об интеркаляционном механизме взаимодействия. В то же время отметим, что CoTButPyP4 порфирины имея аксиальный лиганд имеют определенную "толщину"- приблизительно $\sim 5\text{\AA}$. Следовательно для Co-содержащих порфиринов, интеркаляционный механизм взаимодействия с ДНК исключается [108, 109]. Наличие аксиального лиганда исключает полную интеркаляцию этого порфирина, однако полуинтеркаляция порфирина периферийным кольцом возможна. Мы предполагаем, что наблюдаемые эффекты на кривых плавлениях CoTButPyP4/ДНК комплексов рис.32(б), являются результатом полуинтеркаляционного механизма, во время которого один из периферийных колец порфирина может встраиваться между азотистыми основаниями ДНК, а центр порфирина остается на поверхности ДНК.

И наконец, если сравнить параметры плавления комплексов ДНК-порфирина без ионов Mn^{2+} (таблица 9) и в присутствии ионов Mn^{2+} (таблица 10 в следующем §4.3.1), то можно сделать вывод, что в присутствии ионов Mn^{2+} ДНК-порфирин комплекс сильнее стабилизируется (температура плавления возрастает на $11^{\circ}C$).

4.3.1. Термодинамика комплексообразования

Для полного описания ДНК-порфирин взаимодействия необходимо добавить информацию о термодинамике и кинетике комплексообразования. Термодинамические и кинетические данные позволяют достоверно интерпретировать спектроскопические свойства, специфичность связывания, гидродинамические и динамические характеристики комплексов. Следовательно, исследование термодинамических параметров CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов позволяет установить предпочтительный механизм связывания и сделать предварительные выводы о природе сил, стабилизирующих эти комплексы [110].

Существует несколько экспериментальных методов определения энтальпии перехода (ΔH) спираль-клубок ДНК. Количественное рассмотрение действия различных лигандов на стабильность двухспиральной ДНК дало возможность предложить простой метод определения ΔH , в основе которой лежит теория перехода спираль-клубок комплексов ДНК с низкомолекулярными веществами [111]. Энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) перехода спираль-клубок для CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов можно определить непосредственно из экспериментов по кривым плавления с помощью формул (5) [112].

$$\Delta H = \frac{\delta(\Delta T)}{(\delta T_m)^2} \cdot T_0^2 \cdot r, \quad \Delta S = \frac{\Delta H}{T_0} \quad (5)$$

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

где $r = [\text{порфирин}]/[\text{ДНК}]$ и $r \ll 1$, T_m и ΔT_m - температура и ширина интервала плавления комплексов ДНК с порфирином при определенных значениях r , а T_0 и ΔT_0 те же параметры, но без порфирина.

В таблице 10 приведены термодинамические параметры для обоих комплексов (CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК) при низкой ионной силе.

Таблица 10. Термодинамические параметры CuTButPyP4/ДНК и CoTButPyP4/ДНК комплексов при наличии $\nu = 0.5$ ионов Mn^{2+} в растворе.

CuButPyP4/DNA				
r [P]/[DNA]	T_m	ΔT	ΔH (ккал/моль)	ΔS (ккал/моль·K)
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
CoButPyP4/DNA				
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

Как видно из таблицы 10, для CuTButPyP4/ДНК комплекса, при $r \leq 0.03$ изменения энтальпии и энтропии отрицательны. При дальнейшем увеличении концентрации порфирина, при $r \geq 0.05$ энтальпия и энтропия положительны. В случае CoTButPyP4 порфирина отрицательные (благоприятные) изменения ΔH наблюдаются только при низких концентрациях ($r=0.001$ и $r=0.01$). При больших значениях r , как для Cu - порфирина, так и для Co - порфирина получаются положительные значения для изменения ΔH и ΔS . Известно, что интеркаляция порфиринов - энтальпийно-выгодный процесс и характеризуется отрицательными ΔH , а внешнее связывание - положительными ΔH и относительно большими положительными ΔS .

Анализируя данные таблицы 10 можно сделать следующие выводы, что отрицательные изменения энтальпии при низких значениях r свидетельствуют о том, что CuTButPyP4 порфирин взаимодействует путем интеркаляции, которая обусловлена стэкингом оснований и электростатическими взаимодействиями между положительными заряженными периферийными группами порфирина и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. При более высоких значениях r изменения энтальпии становятся положительными (невыгодными), что свидетельствует, что тот же самый порфирин при более высоких концентрациях взаимодействует с ДНК и внешним способом.

Отрицательные значения ΔH 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 полученными спектрами КД исследуемых комплексов (см предыдущий раздел).

Вывод. При наличии ионов Mn^{2+} в растворе взаимодействие низких концентраций CoTButPyP4 с ДНК происходит методом полуинтеркаляции, а при более высоких концентрациях происходит и внешнее связывание.

ВЫВОДЫ

1. Н
а основании спектральных исследований впервые проведен полный термодинамический анализ связывания ТОЕРуР4, CuТОЕРуР4 и CoТОЕРуР4 с А-формой ДНК. Для всех соединений получены значения ΔG , ΔH , ΔS .
2. У
становлено, что в условиях низких ионных сил изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) имеет практически одинаковое значение (~11 ккал/моль) при связывании всех порфиринов с А- и В-формами ДНК.
3. П
оказано, что существует корреляция между изменением термодинамических потенциалов и способом связывания порфиринов: отрицательное значение энтальпии связывания (ΔH) характеризуют интеркаляционный способ связывания, в то время как положительные ΔH и большие значения ΔS характеризуют внешнее связывание.
4. У
величение ионной силы приводит к уменьшению константы связывания с ДНК всех порфиринов.
5. У
величение 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 слабо зависит от ионной силы.
6. Температура плавления комплексов CuTButPyP4 и CoTButPyP4 с ДНК в присутствии ионов Mn^{2+} на 15-20 °С выше, чем без ионов.
7. В присутствии ионов Mn^{2+} в растворе взаимодействие низких концентраций CoTButPyP4 с ДНК происходит методом

полуинтеркаляции, а CuTButPyP4 - методом интеркаляции, а при более высоких концентрациях оба порфирина предпочитают внешнее связывание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J., Crick F. //Molecular structure of nucleic acids. // Nature 171 (4356): p. 737–738 (1953)
2. Зенгер В. // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.// “Мир”: Москва, (1987).
3. Кантор Ч., Шиммел П. // Биофизическая химия. // “Мир”: Москва, том1, (1985).
4. Andrew D. Bates, Anthony Maxwell // DNA Topology. // Oxford University Press. (1993)
5. Jack A. Tuszynski, Michal Kurzynski // Introduction to molecular biophysics. // Boca Raton London New York Washington, CRC Press LLC. (2003)
6. Франк-Каменецкий М.Д. // Флуктуационная подвижность ДНК.// Мол. Биол., том 17 № 3, с. 639-652. (1983).
7. Arnott S. // The geometry of nucleic acids.// Prog. Biophys. Mol. Biol., Vol 11, p. 265-319 (1970).
8. Иванов В.И.//А-форма ДНК: В поисках биологической роли.// Молекуляр. Биология.Том 28, с.1258-1271 (1994)
9. Иванов В.И. // А-ДНК.// Соросовский Образовательный Журнал, №1, с.2-7, (1998)
10. Иванов В.И.//Двойная спираль ДНК.// Молекуляр. Биология.Том 17, №3, с.616-621 (1983).
11. Арутюнян С.Г. // Влияние лигандов на структуру и стабильность ДНК как одномерного кристалла.// Дисс. докт. физ-мат. наук, Ереван, (1993)

12. Mohr S.C., Sokolov N.V., and et al. // Binding of small acid-soluble spore proteins from *Bacillus subtilis* changes the conformation of DNA from B to A. // *Proc Nat. Acad. Sci. USA.* 88: p.77-81, (1991)
13. Becker M.M. and Wang Z. // B-A transitions within a 5 S ribosomal RNA gene are highly sequence-specific. // *J. Biol. Chem.* 264: p. 4163-4167, (1989).
14. Yang X.L., Wang A. H.-J. //Structural studies on atom-specific anticancer drugs acting on DNA // *Pharmacol. Therap.* Vol.83, p. 181-215, (1999)
15. Recidx B.S., Sondhi S.M., Lawn J.W. // Synthetic DNA minorgroove-binding drugs. //7 *Pharmacol. Therap.*, Vol.84, p. 1-111, (1999)
16. Kubinec M.G., Wemmer D.E.// NMR evidence for DNA bound water in solution // *J. Am Chem. Soc.* Vol. 114, p. 8739-8740, (1992)
17. Liepinsh E., Otting G., Wuthrich K. //NMR observation of individual molecules of hydration water bound to DNA duplexes: direct evidence for a spine of hydration water present in aqueous solution//*Nucleic Acids Res.* Vol.20(24), p. 6549-6553, (1993).
18. Wang A.H., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., Boom J.H. van, Marel G.van der, Rich A. //Molecular structure of a left-handed double-helical DNA fragment at atomic resolution.// *Nature* 282, p. 680-686, (1979)
19. Herbert A. and Rich A. //Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica*// Vol106: p. 37-47, (1999)
20. Nguen B., Neidle S., Wilson D.W. //A role for water molecules in DNA-Ligand minor groove recognition. // *Ace. Chem. Res.* Vol.42, p. 11-21, (2009)
21. Denisor V.P., Carlstrom G., Halle B. // Kinetics of DNA hydration // *J. Mol. Biol.* Vol.268, p. 118-136, (1997)
22. Chuprina VP. //Regularities in formation of the spine of hydration in the DNA minor groove and its influence on the DNA structure.// *FEBS Lett.* Vol **186**(1): p.98–102, (1985)
23. Goldblum A, Perahia D, Pullman A. //Hydration scheme of the complementary base-pairs of DNA. // *FEBS Lett.* Vol 91(2):p. 213–215, (1978)

24. Chalikian T.V., Sarvazyan A.P., Breslauer KJ.//Hydration and partial compressibility of biological compounds // *Biophys. Chem.*, Vol.51, p. 89-109, (1994)
25. Bloomfield VA, Crothers DM, Tinoco I. // In:Nucleic acids: structures, properties, and functions.//Sausalito, Calif.: University Science Books. (2000)
26. Girod J.C., Johnson,W.C.J., Huntington,S.K. and Maestre,M.F. // Conformation of deoxyribonucleic acid in alcohol solutions.// *Biochemistry*, Vol12, p. 5092–5096, (1973)
27. Anderson C.F, Record M.T.//Ion distributions around DNA and other cylindrical polyions: theoretical descriptions and physical implications.// *Annu Rev Biophys, Biophys Chem*;Vol. 19, p. 423–465, (1990)
28. Андроникашвили Э.Л., Есипова Н.Г.//Роль металлов в развитии некоторых опухолевых процессов// *Биофизика*, том 27, с.1022-1026, (1982).
29. Зигель Г.// Ионы металлов в биологических системах.// “Мир”, Москва, (1982)
30. Благой Ю.П., Сорокин В.А., Валеев В.А. //Спектральное исследование связывания оснований ДНК с ионами магния и кальция.// *Мол. биол.* том 14, с. 595-605 (1980).
31. Richard Owczarzy, Yong You, Bernardo G. Moreira, Jeffrey A. Manthey, Lingyan Huang, Mark A. Behlke, and Joseph A. Walder //Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures.// *Biochemistry*43, p. 3537-3554 (2004).
32. Далян Е.Б.//Структурообразование в комплексах ДНК - лиганд. Обратимое и необратимое связывание.// *Дисс. докт. физ-мат. наук*, Ереван, (2003)
33. Smith K.M. // *Porphyrins and Metalloporphyrins.*// Ed., Elsevier, Amsterdam (1975).
34. Zenkevich E.I., Borczykowski C., Shulga A.M., Bachilo S.M., Rempel U., Willert A.//Self-assembled nanoscale photomimetic models: structure and related dynamics.// *Chemical Physics* 275, No 1-3, p. 185-209 (2002) .

35. Jacson A.H., Kenner G.W. // Recent developments in porphyrin chemistry.// Biochem Soc. Symp. 28, p. 3-18 (1968).
36. Ениколопян Н.С. //Порфирины: структура, свойства, синтез.// М. : Наука, (1985).
37. Pasternack R.F., Gibbs E.J. // Porphyrin and metalloporphyrin interactions with nucleic acids. Metal ions in biological systems.// Marcel Dekker, NewYork, Vol 33, p.367-397 (1996).
38. Galievsky V.A., Chirvony V.S., Kruglik S.G., Ermolenkov V.V., Orlovich V.A., Otto C., Mojzes P., Turpin P-Y. // Excited states of water-soluble metal porphyrins as microenvironmental probes for DNA and DNA-model compounds: time-resolved transient absorption and resonance Raman studies of Ni(TMPyP4) in [poly(dG-dC)]₂ and [poly(dA-dT)]₂.// J.Phys.Chem., Vol 100, p.12649-12656 (1996).
39. Pasternack R.F., Francesconi L., Raff D., and Spiro E. //Aggregation of nickel(II), copper(II), and zinc(II) derivatives of water-soluble porphyrins.// Inorg. Chem., Vol 12, p. 2606-2611 (1973).
40. LeGoff E., Cheng D.O. // In Porphyrin chemistry advances / Ed. F.R.Longo. Ann Arbor (Mich), p.153-156 (1979).
41. Jacson A.H., Kenner G.W. //New syntheses of porphyrins and related tetrapyrroles.// Nature, 215(5106), p. 1126-1128 (1967).
42. Sari M.A., Battioni J.P., Dupre D., Mansuy D., and Lepecq. J.B. // Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum requirements for interaction.// Biochemistry. Vol 29: p.4205– 4215, (1990).
43. Kuroda R., Takahashi E., Austin C.A., Fisher L.M. //DNA binding and intercalation by novel porphyrins: role of charge and substituents probed by DNase I footprinting and topoisomerase I unwinding.// FEBS Letters, Vol262, №2, p.293-298, (1990).

44. Мадакян В.Н., Казарян Р.К., Хачатрян М.А., Степанян А.С., Куртикян Т.С., Ордян М.Б. //Новые производные мезо-тетра(4-пиридил) порфина и некоторые их превращения.// Химия Гетероциклических Соединений, №2, с.212-216, (1986).
45. Hui X., Gresh N., Pullman B. // Modelling of the binding specificity in the interactions of cationic porphyrins with DNA. // Nucl. Acids Res., Vol18, №5, p.1109-1114, (1990).
46. Barnes N.R., Schreiner A.F., Finnegan M.G., Jonson M.K. //5,10,15,20-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrinatopalladium(II) PdP(2), with B-DNA duplexes poly (G-C)₂, poly (A-T)₂, and CT DNA by using combined MCD, CD and optical data.// Biospectroscopy Vol4, №5, p.341-352 (1999).
47. Далян Е.Б. //Взаимодействие мезо-тетра (N-оксиэтилпиридил) порфиринов с ДНК. Эффект положения боковых групп.// Биофизика, том 47, №2, с.253-258, (2002).
48. Bennett M, Krahl A., Wien F., Garman E., McKenna R., Sanderson M. //A DNA-porphyrin minor-groove complex at atomic resolution: The structural consequences of polrphyrin ruffling. // PNAS, vol.97, №17, p. 9476-9481, (2000).
49. Fiel R.J., Howard J.C., Mark E.H., Datta Gupta N. // Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation.// Nucl. Acid Res., Vol6, №9, p.3093- 3118, (1979).
50. Pasternack R.F., Gibbs E.J., Gaudemer A., Antebi A., Bassner S., Do Poy L., Tirner D.H., Williams A., Laplace F., Lansard M.N., Merienne C., Perree-Fauvet M. //Molecular complexes of nucleosides and nucleotides with a monomeric cationic porphyrin and some of its metal derivatives.// J.Amer.Chem.Soc., Vol107, p.8179-8186, (1985).
51. McMillin D.R., McNett K.M. // Photoprocesses of Copper Complexes that Bind to DNA. // Chemical Reviews Vol98, №3, p.1201-1219, (1998).
52. Zimmer C., W€ahnert U.//Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological

- investigations of the genetic material. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* Vol47, p.31–112, (1986).
53. Pasternack R. F., Giannetto A. // *Self-Assembly of Porphyrins on Nucleic Acids and Polypeptides* // *J. Am. Chem. Soc.*, Vol 113, p.7799-7800, (1991).
54. Pasternack R. F., Bustamante C., Collings P. J., Giannetto A., Gibbs E. J. // *Porphyrim Assemblies on DNA as Studied by a Resonance Light-Scattering Technique*.// *J. Am. Chem. Soc.*, Vol 115, p.5393-5399, (1993).
55. Fiel R.J., Munson B.R.// *Binding of meso-tetra (4-N-methylpyridyl) porphine to DNA*.// *Nucleic Acid Research*, Vol 8(12), p.2835-2842 (1980).
56. Pasternack R. F., Gibbs E. J., Villafranca J. J. // *Interactions of Porphyrins with Nucleic Acids*.// *Biochemistry*, Vol 22, p.2406–2414, (1983).
57. Lipscomb L.A., Zhou F.X., Presnell S.R., Woo R.J., Peek M.E., Plaskon R.R. // *Structure of a DNA–porphyrin complex*.// *Biochemistry*, Vol 35, p.2818-2823, (1996).
58. Kubat P., Lang K., Anzenbacher P., Jursikova K., Kral V., Ehrenberg B. // *Interaction of novel cationic meso-tetraphenylporphyrins in the ground and excited states with DNA and nucleotides*.// *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, Vol11, p.933–942, (2000).
59. Blom N., Odo L., Nakamoto K. // *Resonance Raman Studies of Metal Tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine: Band Assignments, Structure-Sensitive Bands, and Species Equilibria*.// *J. Phys. Chem.*, Vol 90, p.2847-2852, (1986).
60. Strahan G.D., Lu D., Tsuboi M., Nakamoto K.J. // *Resonance Raman spectra of electronically excited, water-soluble copper(II) porphyrins bound to oligonucleotides: possibility of translocation from a GC to an AT site*.// *Phys. Chem.*, Vol 96, (1992).
61. Suh D., Chaires J.B. // *Criteria for the mode of binding of DNA binding agents*.// *Bioorg. Med. Chem.* Vol 3, p. 723–728, (1995).
62. Zimmer C., W€ahnert U. // *Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and*

- biological investigations of the genetic material. // Prog. Biophys. Mol. Biol. Vol47, p. 31–112, (1986).
63. Gibbs E.J. and Pasternack R.F.//Interaction of porphyrins and metalloporphyrins with nucleic acids.// Semin Hematol. Vol.26(2): p.77-85, (1989).
64. Pasternack R. F., Antebi A., Ehrlich B., David S. // Interactions of Porphyrins with Nucleotides and Nucleic Acids.// Elsevier, Journal of Molecular Catalysis, Vol23, p.235-242, (1984).
65. Lee S., Jeon S.H., Kim S.W., Han H.G.Jang, and S. K. Kim // Classification of CD and absorption spectra in the Soret band of H₂TMPyP bound to various synthetic polynucleotides.// Biophys. Chem. Vol 90, p.35-45, (2001).
66. Carvlin M.J., Datta-Gupta N., Fiel R.J. // Circular dichroism spectroscopy of a cationic porphyrin bound to DNA.// Biochem.Biophys.Res.Comm., Vol 108, №1, p. 66-73, (1982).
67. Wing R., Drew H., Takano T. et al. // Cristal structure analyses of a complete turn of B-DNA.// Nature (London), Vol 287,№5784, p. 755-758 (1980).
68. Yang J.T. and Samejima T.// Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism of Nucleic Acids.// Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.Vol 9, p. 223-300, (1969).
69. Kuroda R., Tanaka H. // DNA – Porphyrin Interactions probed by Induced CD Spectroscopy//. J. Chem. Soc., Chem. Commun., p.1575-1576, (1994).
70. Fixman M. and Freire J.J. // Theory of DNA Melting Curves.// Biopolymers Vol 16(12), p.2693-2704, (1977).
71. Rice S.A., Doty P. //The thermal denaturation of deoxyribose nucleic acid.// J. Am. Chem. Soc., Vol 79, №15, p.3937-3947, (1957).
72. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. //Переход спираль-клубок в ДНК.// Успехи физ. наук, т.105(3), с.479-519, (1971).
73. Gruenwendel D.W., Hsu C., Lu O.S. // The effects of aqueous neutral salt solutions on the melting temperatures of deoxyribonucleic acids.// Biopolymers Vol 10, p.47-68, (1971).

74. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A. and Karapetyan A.T. // Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA.// *Experimental and Molecular Medicine*, Vol 33, №4, p. 205-208, (2001).
75. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G. and Karapetyan A.T.// The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single-and double-stranded structures. // *Experimental and Molecular Medicine*, Vol 35, № 6, p. 527-533, (2003).
76. Karapetian A.T., Vardevanian P.O. and Frank-Kamenetskii M.D.// Enthalpy of helix-Coil transition of DNA: dependence on Na⁺ concentration and CD-content// *JBSD*, Vol. 8, №1, p.131-138, (1990).
77. Usatyi A.F. and Shlyakhtenko L.S. // Melting of DNA in Ethanol-Water Solutions// *Biopolymers*. Vol.13, p.2435-2446 (1974).
78. Ivanov V.I., Malenkov G.G., Minchenkova L.E., Minyat E.E., Frank-Kamenetski M.D. and Schyolkina A.K.//The nature of CC/GG contacts facilitate the B to A transition of DNA in solution.// *Biopolymers*. Vol.12(1), p.89-110, (1973).
79. Lazurkin Yu.S., Frank-Kamenetski M.D and Trifonov E.N. //Prespectives report: Melting of DNA: Its study and application as a research method.// *Biopolymers*. Vol.9, p.1253-1306, (1970).
80. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Minyat E.E., Frank-Kamenetski M.D., Schyolkina A.K. // The B to A transition of DNA in solution// *J. Mol. Biol.* Vol 87, p.817-833, (1974).
81. Geiduschek E.P. and Grey I.// Non-Aqueous Solutions of Sodium Desoxyribose-Nucleate// , *J. Amer. Chem. Soc.*, Vol 78 (4), pp 879–880, (1956).
82. Avetisyan A.A. //Interaction of TOEPyP4 Porphyrin with A form DNA.// *Proceedings of the YSU, Physics and Mathematical Sciences* №3, p. 43-48, (2014).
83. McGhee J.D., Von Hippel P.H. //Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and noncooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice.//*J. Mol. Biol.*, Vol 86, p.469-489, (1974).

84. Bresloff J. L., Crothers D. M. // Equilibrium studies of ethidium – polynucleotide interactions.// *Biochemistry* Vol 20, p.3547-3553, (1981).
85. Correia J.J., Chaires J.B. // Analysis of Drug-DNA Binding Isotherms: A Monte Carlo Approach.// *Methods in Enzymology*, №240, p.593-614, (1994).
86. Haq I. // Thermodynamics of drug-DNA intercalations.// *Arch. Biochem. Biophys.*, №403, p.1-15 (2002).
87. Haq I., Trent J.O., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C. //Intercalative G-Tetraplex Stabilization of Telomeric DNA by a Cationic Porphyrin.// *J. Am. Chem. Soc.*, Vol 121, p.1768-1779, (1999).
88. Chaires J.B. // Energetics of drug–DNA interactions. // *Biopolymers*, Vol 44 (3), p.201-215, (1997).
89. Haq I., Ladbury J. // Drug–DNA recognition: energetics and implications for design.// *J. Mol. Recognit*, Vol 13, p.188–198, (2000).
90. Bennett M; Krah A; Wien F; Garman E; McKenna R; Sanderson M; Neidle S //A DNA-porphyrin minor-groove complex at atomic resolution: the structural consequences of porphyrin ruffling.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol97(17), p. 9476-9481, (2000).
91. Nordén, B., Kubista M., and Kurucsev T. //Linear dichroism spectroscopy of nucleic acids. // *Q. Rev. Biophys.*Vol 25, p. 151-170, (1992).
92. Scatchard G. // The attraction of proteins for small molecules and ions.// *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol 51, p.66, (1949).
93. Leng F., Chaires J.B., Waring M.J. // Energetics of echinomycin binding to DNA.// *Nucleic Acids Res.*, Vol 31, №21, p.6191–6197, (2003).
94. Schmitz K.S. // Inapplicability of “Scatchard-type” analysis to highly cooperative binding systems.// *Biopolymers*, Vol 16, №1, p.143-155, (2004).
95. Bujalowski W., Lohman T.M. // A general method of analysis of ligand-macromolecule equilibria using a spectroscopic signal from the ligand to monitor binding. Application to *Escherichia coli* single-strand binding protein-nucleic acid interactions.// *Biochemistry*, Vol 26, №11, p 3099-3106, (1987).

96. Avetisyan A.A., Dalyan Y.B. // 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).
97. Carvlin M.J.and Fiel R.J. //Intercalative and nonintercalative binding of large cationic porphyrin ligands to calf thymus DNA.// Nucleic Acids Res. Vol 11, p. 6121-6139, (1983).
98. Ghazaryan A.A., Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Tikomirova A., Tauiler N.,Wells J. and Chalikian T.V.// Thermodynamics of Interactions of Water-Soluble Porphyrins with RNA Duplexes.// JACS, Vol128, p. 1914-1921 (2006).
99. Avetisyan A.A., Dalyan Y.B.// Thermodynamics of interactions of CoTOEPyP4 porphyrin with A-DNA.// Proseedings of the Yerevan state University, Chemical and Biological Sciences, No.3, p. 40-45 (2014).
100. Avetisyan A.A., Dalyan Y.B. // The Comparative Study of H₂TOEPyP4 and CoTOEPyP4 Porphyrins with A-DNA.//JBSD, Albany, Conversation 19, Vol33(1), p. 87 (2015).
101. Алоян Л.Р., Ананян Г.В., Варданян В.И., Далян Е.Б.//Влияние боковых групп порфиринов на их взаимодействие с ДНК.// Ученые записки ЕГУ, №3, p. 40-45, (2006).
102. Алоян Л.Р., Ананян Г.В., Далян Е.Б. //Взаимодействие порфиринов с ДНК. Эффект ионной силы.// Конф. “Современные проблемы молекулярной биофизики”, Санкт-Петербург, с.31, (2006).
103. Далян Е.Б., Алоян Л.Р., Ананян Г.В., Варданян В.И., Казарян А.А //Взаимодействие порфиринов с ДНК. Эффект центрального металла и бокового радикала.// XIII Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул. Санкт-Петербург, с.181, (2006).
104. Ananyan G.V., Avetisyan A.A., Dalyan Y.B.// TheComparativeStudy ofCuTAlPyP(4) and CoTAlPyP(4) Porphyrins with DNA.//JBSD, Albany, Conversation 16Vol26 (1), p. 901-902 (2009).

105. Avetisyan A., Ananyan G., Ghazaryan A., Aloyan L., Dalyan Y. //The comparative study of CuTButPyP4 and CoTButPyP4 porphyrins with DNA.// Int. Conf. "Biotechnology and health-3" & DAAD Alumni seminar, p. 122 (2009).
106. Kosianenko N.A., Selman-Housein G.S., Uverskii V.N., Frisman .V.// Effect of Mn²⁺ and Mg²⁺ ions on DNA conformation.// Mol.Biol. №21, p. 140-146 (1987).
107. Haroutiunian S.G., Dalian Y.B., Aslanian V.M., Akhrem A.A. // A method for determining the relative effect of ligands on AT and GC base pairs in DNA: applications to metal ions, protons and two amino acids.// Nucleic Acids Res. №18(23), p. 6413-6417 (1990).
108. Shelstedt U., Kim S. K., Carter P., Goodisman J., Vollano J.F., Norden B., and.Dabrowiak J.C. //Interaction of cationic porphyrins with DNA.// Biochemistry.Vol33(2), p.417-426 (1994).
109. Hoard J.L.// Stereochemistry of porphyrins and metalloporphyrins.// Amsterdam: Elsevier, p.317-380, (1975).
110. Ananyan G., Avetisyan A., Aloyan L., Dalyan Y.// The stability of DNA-porphyrin complexes in the presence of Mn(II) ions.// Biophysical Chemistry №156, p. 96-101 (2011).
111. Frank-Kamenetskii M.D., Karapetian A.T.// The theory of helix-coil transition of DNA with low-molecular ligands.// Mol. Biol. USSR №6, p.621-627 (1972).
112. Karapetian A.T., Vardevanyan P.O., Babayan Yu.S., Vardapetyan R.R., Panosyan G.A., Aslanyan V.M.// Simple method of definition of an average DNA nucleotide composition from the melting curves.// Biophys. №28 (1), p. 130-131 (1983).