

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՆՏՈՆՅԱՆ ԱՐԱ ՊԵՏԻՎԻ

ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ԻՆՏԵՐԿԱԼՅԱՏՈՐ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գ.00.02 - Կենսաֆիզիկա և կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2017

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АНТОНЯН АРА ПЕТИКОВИЧ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИГАНДОВ ИНТЕРКАЛЯТОРОВ С ДНК

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук по специальности
03.00.02 – Биофизика и биоинформатика

ЕРЕВАН 2017

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական խորհրդատու՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ.
Վարդևանյան Պ.Հ.

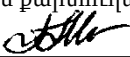
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ.
Վարդապետյան Հ.Ռ.
Ֆիզ. մաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆ.
Սորոգով Վ.Ֆ.

Առաջատար կազմակերպություն՝ քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Գրիգորյան Կ. Ռ.
Վրաստանի ԳԱ Է.Լ. Անդրոնիկաշվիլիի
անվան ֆիզիկայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2017թ. հունիսի 14-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 Մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Սանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2017թ. մայիսի 12-ին:

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

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный консультант: доктор биол. наук, проф. Вардеванян П.О.
Официальные оппоненты: доктор биол. наук, проф. Вардапетян Р.Р.
доктор физ. мат. наук, проф. Морозов В.Ф.
доктор. хим. наук, проф. Григорян К. Р.

Ведущая организация: Институт физики им. Э.Л. Андроникашвили
Академии наук Грузии

Защита диссертации состоится 14-го июня 2017г. в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 12-го мая 2017г.

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

 М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Интерес к изучению процессов, протекающих с участием ДНК, обусловлен их прикладным значением и возможностью использования в различных областях науки и промышленных технологиях. При этом, существенную роль играет конформационная подвижность ДНК, поскольку ее пространственная структура важна для реализации того или иного процесса (Graves, Velea, 2001, Франк-Каменецкий, 2004). Каждая конформация ДНК характеризуется определенным значением плотности заряда, трехмерной структурой, жесткостью, а также природой и составом растворителя, присутствием других молекул или атомов. ДНК является заряженной макромолекулой, что, при ее взаимодействии с малыми молекулами, может способствовать поиску способа направленного влияния на ее свойства и функции, поэтому, исследования по взаимодействию ДНК и малых молекул важны для решения проблемы направленного синтеза новых низкомолекулярных соединений, применяющихся в фармакологии и медицине.

Являясь достаточно жестким и заряженным полимером, ДНК представляет собой уникальный объект исследования не только из-за высокой биологической ценности. В водном растворе высокомолекулярная двуспиральная ДНК приобретает высокую степень свободы и может вести себя как статистический клубок, в то время как в ядре клетки она находится в конденсированном состоянии, которое обеспечивается за счет взаимодействия с катионными группами гистонов и ионами металлов, подавляющих электростатическое отталкивание заряженных групп макромолекулы. Тем не менее, конденсированное состояние ДНК не препятствует ее активному участию в различных биологических процессах, поскольку она может обратно переходить из конденсированного в относительно свободное состояние. Эта способность ДНК переходить в компактное состояние с сохранением своей вторичной структуры является важнейшим свойством, необходимым для ее функционирования.

Исследование комплексообразования молекулы ДНК с биологически активными соединениями различной природы на уровне модельных систем (водных растворов при малых концентрациях) представляет интерес как для понимания конформационных превращений макромолекулы в различных биологических процессах, так и для создания новых биологически активных препаратов. В последнее время, в связи с развитием новых технологий, возникла необходимость направленного внедрения заданного генетического материала в клетки-мишени. В связи с этим большой интерес получает изучение комплексов ДНК с различными веществами, связывающими с ней нековалентно и проявляющими биологическую активность. Возможность влияния на протекающие в биологических системах процессы путем введения определенных веществ, взаимодействующих с ДНК, расширяет перспективы создания новых лекарственных форм. С этой точки зрения, основной принцип действия используемых в настоящее время в практической медицине противоопухолевых препаратов основан на их связывание с молекулой ДНК в клетке, для чего необходима достоверная информация о взаимодействии лигандов с ДНК (Graves, Velea, 2001, Франк-Каменецкий, 2004).

Среди биологически активных соединений, представляющих практическое значение, особое место занимают интеркаляторы, в числе которых, мультимодальные лиганды - бромистый этидий (БЭ), метиленовый синий (МС), а также другие вещества. Изучение комплексообразования этих лигандов с ДНК может служить

базисом для исследований молекулярного механизма действия других препаратов (в том числе неинтеркаляторов). Сравнение данных, полученных для известных биологически активных соединений и их аналогов может способствовать предварительному отбору препаратов, минуя трудоемкую и дорогую процедуру медико-биологических тестов. Использование физико-химических методов для исследования взаимодействия лигандов с ДНК на уровне модельных систем может также дать ценную информацию о влиянии стерических и структурных особенностей этих комплексов на их биологическую активность.

Такой подход разработан в настоящей работе, что и обосновывает актуальность темы предлагаемой диссертационной работы.

Цель и задачи диссертационной работы. Целью диссертационной работы явилась разработка теории мультимодального связывания лигандов с ДНК, экспериментальная проверка теоретических выводов на примере БЭ, определение термодинамических параметров связывания этого лиганда с двухцепочечной и одноцепочечной ДНК несколькими способами и применение разработанной теории для выяснения особенностей связывания интеркалятора МС и неинтеркалятора Hoechst 33258 (H33258).

Для осуществления поставленной цели, в задачи работы входило:

- Разработка теоретической модели для исследования взаимодействия мультимодальных лигандов с двухцепочечной (дц-) и одноцепочечной (оц) ДНК;
- Экспериментальное исследование взаимодействия БЭ, МС и H33258 с ДНК;
- Изучение особенностей совместного взаимодействия БЭ и H33258, БЭ и МС с ДНК.
- Определение термодинамических параметров связывания БЭ, H33258 и МС с ДНК;
- Изучение влияния ионной силы раствора на особенности связывания указанных лигандов с ДНК.

На защиту выносятся:

- Теоретическая модель, разработанная для мультимодального взаимодействия лиганда с ДНК;
- Экспериментально полученные величины параметров комплексообразования БЭ, МС и H33258 с ДНК;
- Результаты экспериментальных исследований по одновременному взаимодействию БЭ и H33258, БЭ и МС с ДНК;
- Результаты экспериментальных исследований по определению влияния ионной силы раствора на особенности связывания БЭ, МС и H33258 с ДНК.

Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы. Полученные в работе теоретические и экспериментальные данные представляют новизну, выявляя существование подкласса лигандов-интеркаляторов, способных связываться с дц- и оц- ДНК несколькими способами. Так БЭ, а также МС связываются с дц-ДНК интеркаляционным, полунтеркаляционным и электростатическим способами. Впервые показано, что способы связывания БЭ с ДНК универсальны и не зависят от условий среды (ионной силы, pH раствора), в то время как проявление способов связывания МС с ДНК зависит от ионной силы раствора.

Изменение ионной силы раствора влияет также на механизмы взаимодействия желобково связывающегося с ДНК. H33258, как и БЭ и МС проявляет

мультимодальное связывание с дц-ДНК, несмотря на то, что значения термодинамических параметров, оцененных экспериментально, расходятся с теоретически рассчитанными. Впервые экспериментально выявлены особенности совместного связывания БЭ и МС, БЭ и Н33258 с ДНК. В обоих случаях возникает конкуренция между лигандами. При совместном связывании взаимное усиление (синергизм) отдельных влияний БЭ и Н33258 на параметры плавления ДНК проявляется при низких концентрациях, которое переходит в конкуренцию при увеличении концентраций обоих лигандов.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные теоретические и экспериментальные данные позволяют выявить глубинные свойства лигандов при взаимодействии с ДНК, выяснить свойственные им аспекты молекулярного механизма связывания с НК различными способами, а также влияния этих способов на структурно-функциональные свойства ДНК. Полученные данные также позволяют установить влияние факторов среды на особенности мультимодального связывания различных низкомолекулярных веществ с ДНК и определить природу движущих сил, лежащих в основе образования комплексов.

Эти данные могут стать фундаментом для скрининга биологически активных веществ, связывающихся с ДНК, а также лечь в основу синтеза новых терапевтических препаратов, имеющих направленное влияние на структурно-функциональные свойства ДНК с одной стороны, и менее токсичные для клетки в целом, с другой. Полученные данные могут быть также использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ и в научных лабораториях, занимающихся исследованием по взаимодействию лигандов с ДНК.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры биофизики ЕГУ и на следующих научных конференциях: International Conversation, Albany USA, 1997; 2001; 2007; 2011; 2013; Тезисы II международного симпозиума “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии”, 29-31 мая, Дубна, 2001; “The Genome and Beyond – Genomics and Structural Biology for Medicine”, Miami, 2002, Feb, 2-6; International Alumni Seminar on «Biotechnology and Health», (Armenia), 2005; 2008; International Symposium on Biomolecules: Theory to experiment. May 17-21, 2010, Tsakhkadzor, Armenia; International Conference “Current Problems of Chemical Physics” dedicated to the 50th anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA. 9-12 Oct., 2012, Yerevan; International Conference Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior, 27-29 May 2013, Yerevan, Armenia; Двенадцатый съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск 28-30 июня, 2016.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 31 научных статей и 12 тезисов в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения и пяти глав, изложена на 224 страницах. Диссертация содержит 45 рисунков, 4 схемы, 12 таблиц и список цитируемой литературы из 296 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обсуждаются цель, актуальность и научное значение, а также описывается структура диссертационной работы. В первой главе приведены литературные данные о механизмах обратимого связывания лигандов с ДНК. Во второй главе представлена теория мультимодального взаимодействия лигандов с

ДНК. В третьей главе представлены экспериментальные результаты исследования энергетики кооперативных переходов комплексов ДНК с бромистым этидием (БЭ), метиленовым синим (МС) и Hoechst 33258. В четвертой главе приведены результаты исследований по взаимодействию указанных лигандов с ДНК спектральными и электрохимическими методами. В пятой главе приведены материалы и методы исследования.

В работе были использованы следующие вещества: синтетические полинуклеотиды poly(dA)-poly(dT), poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], ДНК тимуса теленка (ТТ, среднее ГЦ содержание - 42%), Cl. perfr. (среднее ГЦ содержание - 31%), M. lysodeikt. (среднее ГЦ содержание - 71%), Hoechst 33258 (H33258), ("Sigma" (США)), метиленовый синий (МС) ("Aldrich", (США)), бромистый этидий - БЭ, "Serva" (Германия), HCl, NaOH (ос.ч.), ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), деионизированная вода (R=16 МОм), азот в газовом состоянии (для барботажа растворов электролитов). Все препараты были ультрачистые и использованы без дополнительной очистки.

Концентрации использованных препаратов определены спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: poly(dA)-poly(dT) - $\epsilon_{260}=6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], ДНК тимуса теленка и ДНК M. lysod. - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ДНК Cl. perfr. - $\epsilon_{260}=7400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; БЭ - $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Hoechst 33258 - $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; МС - $\epsilon_{668}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Исследования проводились при ионных силах раствора - $\mu=0,002; 0,004; 0,01; 0,02$. Кислотная денатурация ДНК и комплексов ДНК-БЭ осуществлялась в интервале изменения pH - $2.5 \leq \text{pH} \leq 7.0$.

Исследования спектроскопическими методами проводились на спектрофотометрах PVE Unicam-SP8-100 (Англия), UV VIS Spectrophotometer Specord 50 Analytik Jena (Германия), Jenway 6715 (Англия), Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия). Спектроскопические измерения осуществлялись в кварцевых кюветтах объемом 3мл, длиной оптического пути 1 см. Измерения в интервале изменения pH - 2.5-7.0 проводили при комнатной температуре ($t=25^\circ\text{C}$), при ионной силе $\mu=2.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами проводилось с помощью спектрофотометра PVE Unicam-SP8-100, нагрев термостабируемых ячеек осуществлялся с помощью программного устройства SP 876 Series 2. Для термодинамических исследований комплексообразования лигандов с ДНК измерения проводились при различных температурах, для чего растворы препаратов нагревались на ультратермостате PVE Unicam (Англия).

Электрохимические измерения проводились на электроанализаторе BAS 100 В/В (США). pH-титрование осуществлялось на иономере универсальный ЭВ-74 (СССР) с электродом измерительный ЭСЛ 63-07. Раствор ДНК титровался 0.2н HCl, с шагом объема добавляемого титранта 2 мкл. Перед измерением значений pH растворы перемешивались на магнитной мешалке. Погрешность значений pH составляла ± 0.05 . Измерения в условиях $\text{pH}=3,0$ проводились при $t=25^\circ\text{C}$.

Титрование растворов исследуемых образцов проводили микропипеткой объемом 10 μl фирмы "Hamilton" (США).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Теоретическое исследование плавления комплексов ДНК с мультимодальными лигандами. Исследования по взаимодействию лигандов с ДНК задаются целью определения стабилизирующего или дестабилизирующего влияния факторов внешней среды на различные конформации ДНК. Эти исследования

позволяют построить теоретические модели комплексообразования различных лигандов с ДНК. С этой точки зрения пионерскими являются первые модели комплексов ДНК с красителями, имеющими прикладное значение, в частности, с БЭ, АМД и др. (Karapetian et al, 1990; Shich et al 1980). Анализ экспериментальных данных по взаимодействию этих лигандов с В-формой ДНК выявил два способа связывания - "сильное" и "слабое" и была построена соответствующая теоретическая модель. Однако, все попытки получить набор реальных термодинамических параметров взаимодействия АМД, БЭ и др., а также ионов некоторых тяжелых металлов с ДНК, которые дали бы хорошее согласие разработанной теории с экспериментом, не увенчались успехом (Karapetian et al, 1990). Надо полагать, что наблюдаемое несоответствие теории с экспериментом связано с тем, что в большинстве случаев лиганды могут одновременно образовывать произвольное число типов комплексов с различными формами ДНК (В, Z, А, клубок и др.), отличающимся друг от друга термодинамическими параметрами взаимодействия (константы связывания, число пар оснований, приходящихся на одно место связывания, и др.). Более того, разнообразие способов взаимодействия лигандов может обнаруживаться не только с двунитевой (Zimmer & Wohnert, 1986), но и с однострунчатой ДНК, но и с РНК. Этот факт не учитывался ни в одной из ранее рассмотренных теоретических моделей.

Следовательно, возникает необходимость рассмотрения такой теоретической модели, в которой учитывается случай мультимодального связывания лигандов (МСЛ) с различными формами ДНК в конкретно рассматриваемом кооперативном переходе, а также степень денатурации и корреляционная длина в зависимости от концентрации лигандов.

Суть предлагаемой модели заключается в следующем. Пусть в растворе имеются молекулы полимера в двух различных формах со значениями числа оснований соответственно N_1 и N_2 , а число областей, на которые разбивается полимер в интервале перехода – n , причем общее число звеньев N остается постоянным в ходе всего процесса перехода из одной формы в другую:

$$N_1 + N_2 = N \quad (1)$$

Предполагается также, что из общего числа молекул лиганда k_i ($i = \overline{1, l}$) связаны с одной формой, k_j ($j = \overline{1+l, m}$) – с другой формой полинуклеотида, а k_0 находится в свободном состоянии. Тогда

$$k = k_0 + \sum_{i=1}^l k_i + \sum_{j=l+1}^m k_j \quad (2)$$

Если r_i ($i = \overline{1, l}$) – число пар оснований, приходящихся на одно место связывания с одной из форм полинуклеотида, а r_j ($j = \overline{1+l, m}$) – с другой, то числа мест связывания соответственно будут N_1/r_i и N_2/r_j . Предполагается, что между отдельными способами связывания, с точки зрения мест посадки, нет взаимодействия.

Если D – полная концентрация скрепок в растворе, P – концентрация фосфатных групп, входящих в состав полинуклеотида, а ϑ – доля одной из двух форм в интервале перехода, то условие постоянства концентрации лиганда (2) примет вид:

$$D = c_0 + \frac{P}{2}(1 - \vartheta) \sum_{i=1}^l c_i + \frac{P}{2} \vartheta \sum_{j=l+1}^m c_j \quad (3)$$

При условии постоянства полной энергии системы с помощью некоторых преобразований (они не приводятся), найдем выражения для изменения температуры $\delta(1/T_m)$ и ширины интервала перехода $\delta(\Delta T/T_m^2)$ под воздействием скрепок:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{\Delta H} \ln \left[\frac{\prod_{i=1}^l (1 - c_i r_i)^{1/r_i}}{\prod_{j=l+1}^m (1 - c_j r_j)^{1/r_j}} \right]_{\vartheta=0,5} \quad (4)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = -\frac{1}{\Delta H} \left[\frac{\partial}{\partial \vartheta} \ln \frac{\prod_{i=1}^l (1 - c_i r_i)^{1/r_i}}{\prod_{j=l+1}^m (1 - c_j r_j)^{1/r_j}} \right]_{\vartheta=0,5} \quad (5)$$

где:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_m}; \quad \delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = \frac{\Delta T}{T_m^2} - \frac{\Delta_0 T}{T_m^2} \quad (6)$$

T_0 – температура перехода ДНК, $\Delta_0 T$ – ширина перехода ДНК, T_m и ΔT – соответствующие параметры для ее комплексов с лигандом, ΔH – энтальпия перехода, приходящаяся на 1 моль пар оснований.

$$c_i = \frac{k_i}{N_1} (i=1, \dots, l), c_j = \frac{k_j}{N_2} (j=1+l, \dots, m)$$

где c_i и c_j – концентрации связанных лигандов с соответствующими формами ДНК.

В случае $K_i P \gg 1$ и $K_j P \gg 1$, $x_i = 1/(c_i r_i - 1)$, $x_j = 1/(c_j r_j - 1)$, $p_i = K_i/K_1$, $p_j = K_j/K_1$ (K – константа связывания лиганда с полинуклеотидом),

$$K_q = \frac{c_q r_q}{c_0 (1 - c_q r_q)}, (q=l, \dots, m) \quad (7)$$

и если x_i^0 есть решение уравнения при $\vartheta=0,5$ (ϑ – степень спиральности):

$$1 - \vartheta \sum_{i=1}^l \frac{p_i}{r_i (x_i + 1)} + \vartheta \sum_{j=l+1}^m \frac{p_j}{r_j (x_j + 1)} = c \quad (8)$$

где $x_i^0 = p_i x_i$ ($i=2, m$), то получаются формулы:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{\Delta H} \ln \left[\frac{\prod_{j=l+1}^m (x_1^0 + p_j)^{1/r_j}}{\prod_{i=1}^l (x_1^0 + p_i)^{1/r_i}} (x_1^0)^{\sum_{i=1}^l \frac{1}{r_i} - \sum_{j=l+1}^m \frac{1}{r_j}} \right], \quad (9)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = \frac{1}{\Delta H} \left[\sum_{j=l+1}^m \frac{p_j}{r_j x_1^0 (x_1^0 + p_j)} - \sum_{i=1}^l \frac{p_i}{r_i x_1^0 (x_1^0 + p_i)} \right] \cdot \left. \frac{\partial x_1^0}{\partial \vartheta} \right|_{\vartheta=0,5}$$

(10)

Соотношения (9) и (10) описывают многопараметрическую зависимость изменения температуры и ширины интервала перехода от концентрации лигандов (мультимодалный лиганд). Они дают возможность определить термодинамические

константы комплексообразования лигандов с ДНК (m, l, r_i, K_i). Это может быть достигнуто путем подбора таких значений набора параметров, при которых имеет место наилучшее согласование теории с экспериментом.

Флуктуационные эффекты при переходе порядок – беспорядок в комплексах ДНК-лиганд. Для анализа флуктуационных эффектов при переходе спираль – клубок двойной спирали ДНК в комплексе с двумя лигандами, связывающимися с нативной и денатурированной ДНК по крайней мере двумя способами также была использована стандартная модель плавления комплексов ДНК–лиганд. Принимается, что раствор содержит два типа лигандов с различными параметрами связывания. Предположим, что константы связывания лигандов с денатурированной ДНК имеют значения K_1' и K_1'' , а константы связывания с нативной ДНК - K_2' и K_2'' . Общее число лигандов - k , число молекул лигандов, связанных с одноцепочечными участками по первому механизму равно k_1' , а по второму - k_1'' , а число молекул, связанных с двухцепочечными участками по первому и второму механизмам равно k_2' и k_2'' , соответственно. Пусть F_1 и F_2 - свободные энергии клубкообразного и спирального состояний из расчета на пару оснований, соответственно, F_0 - свободная энергия инициализации спирали, Ψ_i^α - свободная энергия связывания лиганда ($i=1;2$ и $\alpha=';''$) и W - число микросостояний макромолекулы, соответствующих данной энергии. Таким образом, свободная энергия системы может быть оценена как (Karapetian A.T. et al, 1996; Grigoryan, Z. A. et al, 2014):

$$F = F_1 N_1 + F_2 N_2 + n F_0 + \sum_{i=1,2} \sum_{\alpha=';''} k_i^\alpha \Psi_i^\alpha - T \ln W \quad (11)$$

Используя метод наиболее вероятного распределения, была получена система уравнений для концентраций $c_i^\alpha = k_i^\alpha / N_i$, зависящих от таких параметров системы, как константы связывания (K_i^α), полная концентрация лигандов (D), число центров связывания одного лиганда (r_i^α), общая концентрация фосфатных групп (P) и степень спиральности \mathcal{S} .

Уравнение для эффективного параметра роста спирали имеет вид:

$$S^* = S \frac{(1 - c_1' r_1' / 2) r_1' (1 - c_1'' r_1'' / 2) r_1''}{(1 - c_2' r_2') r_2' (1 - c_2'' r_2'') r_2''}, \quad (12)$$

где - $S = \exp\left(\frac{F_1 - F_2}{T}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT} + \Delta S\right)$ параметр роста спирали чистой ДНК,

ΔH - изменение энтальпии и ΔS - изменение энтропии при образовании одной пары оснований.

Степень спиральности \mathcal{S} является параметром порядка, описывающим переход спираль – клубок, который определяется как

$$\mathcal{S} = \frac{1}{N} \langle N_2 \rangle \quad (13)$$

где $\langle \dots \rangle$ означает термодинамическое среднее. Таким образом, степень спиральности это средняя доля пар оснований, находящихся в спиральной фазе. В то же время, флуктуационные эффекты также являются существенными, особенно для описания кооперативности перехода спираль – клубок, средней длины спирального участка и т. д. Для учета флуктуационных эффектов мы рассмотрели поведение корреляционной длины двунитиевой ДНК, определяемой как масштаб экспоненциального затухания флуктуаций вдоль цепи. Для этого была использована модель, эквивалентная (11), разработанная для описания перехода спираль – клубок в полипептидах и ДНК (Morozov et al., 2004; Badasyan et al., 2014) которая более пригодная для описания флуктуационных эффектов, нежели (11). В этом случае энергия модели может быть представлена как:

$$H\{\gamma\} = U \sum_{i=1}^N \delta_i^{(\Delta)} \quad (14)$$

где N – число повторяющихся единиц, U – энергия стабилизации пары оснований, $\delta_j^{(\Delta)} = \prod_{k=0}^{\Delta-1} \delta(\gamma_{i+k}, 1)$, $\delta(x, 1)$ – символ Кронекера и $\gamma_i = 1, \dots, Q$. Переменная γ_i описывает состояние i – ой повторяющейся единицы. Предполагается, что общее число конформаций равно Q , $\gamma_i = 1$ соответствует спиральной, а остальные $(Q-1)$ – конформациям в клубкообразном состоянии. При этом, выбранные параметры моделей (11) и (14) связаны между собой соотношениями:

$$U(\{c\}, \{r\}) = -RT \ln S^* + RT \ln(Q - 1) \quad (15)$$

и

$$\exp\left(-\frac{F_0}{RT}\right) = Q^{1-\Delta} \quad (16)$$

При этом, параметр Δ имеет смысл персистентной длины одноцепочечной ДНК и оценивается как $\Delta \approx 7$.

Флуктуационные эффекты могут быть описаны с использованием парной корреляционной функции:

$$g_2(r) = \langle \delta_j^{(\Delta)} \delta_{j+r}^{(\Delta)} \rangle - \langle \delta_j^{(\Delta)} \rangle \langle \delta_{j+r}^{(\Delta)} \rangle \quad (17)$$

которая в данном случае описывает статистическую взаимозависимость образования двух пар оснований, удаленных друг от друга на r пар оснований вдоль цепи. Как известно, для одномерной системы парная корреляционная функция затухает (V. F. Morozov, et al., 2004):

$$g_2(r) \sim \exp\left(-r/\xi\right) \quad (18)$$

где ξ – корреляционная длина. В указанной работе также показано, что корреляционная длина одномерной системы удовлетворяет соотношению

$$c \operatorname{th}\left(\frac{1}{2\xi}\right) = \frac{\frac{\partial \theta}{\partial \ln S}}{\theta(1-\theta)} \quad (19)$$

При этом, максимальное значение корреляционной длины достигается при температуре плавления (в точке полуперехода, $\theta = 1/2$) и оценивается как:

$$\xi_0 \approx \frac{1}{2} Q^{\frac{\Delta-1}{2}} \quad (20)$$

Таким образом, при переходе спираль-клубок комплексы ДНК-лиганд демонстрируют такую же кооперативность, как и тепловая денатурация чистой ДНК. При этом, температурный интервал при холодной денатурации этих комплексов

существенно уже, чем этот же интервал при тепловой денатурации как чистой ДНК, так и комплексов ДНК – лиганд.

Денатурация комплексов лигандов с ДНК: Влияние ионной силы раствора.

Уравнения (9) и (10) отражают мультимодальное связывание лигандов с различными формами ДНК. Теоретический анализ экспериментальных данных показывает, что при выбранных условиях БЭ и АМД могут образовать по крайней мере пять типов комплексов, из которых три типа (один “сильный”, но редкий, другой “сильный” и частый, третий – “слабый”, также частый) со спиральной ДНК и два типа (“сильный” и “слабый”) с клубкообразной ДНК.

БЭ, АМД, профлавин, связываясь с ДНК, стабилизируют ее нативную структуру в определенном интервале изменения $\gamma = [\text{лиганд}]/[\text{ДНК}]$ (D/P) - $0 < \gamma \leq 0,5$, вследствие чего T_m этих комплексов возрастает, увеличивается также ΔT . Как показывает разработанная теория (Карапетян и др. 1996), в случае мультимодальных лигандов, кривая зависимости изменения T_m от γ возрастает линейно, а кривая зависимости изменения ΔT от γ приобретает колоколообразную форму. Еще одним заключением разработанной теории является то, что, при высоких значениях γ (при больших концентрациях мультимодального лиганда) кривая зависимости изменения T_m начинает убывать, а кривая зависимости изменения ΔT , приближаясь к нулевому значению, возрастает. В этом случае лиганды, являясь стабилизаторами дц-структуры ДНК, начинают предпочтительнее связываться с ее оц-участками, превращаясь в дестабилизатора дц-структуры.

Полученные на основании экспериментальных исследований по плавлению ДНК и ее комплексов с БЭ в интервале изменения ионной силы $0,002 \leq \mu \leq 0,02$ М данные подтверждают этот теоретический вывод, поскольку кривые плавления комплексов смещены в сторону высоких температур по отношению к кривой плавления ДНК, по мере увеличения концентрации БЭ в растворе (Vardevanyan P.O. et al, 2001). Зависимости $\delta(1/T_m)$ от γ при ионных силах 0,002; 0,01 и 0,02 М, рассчитанные из значений T_m (определенные из кривых плавления) в соответствии с указанной теорией линейно возрастают в интервале изменения $0 < \gamma \leq 0,33$, однако при более высоких концентрациях БЭ эти кривые выходят на плато с последующей тенденцией к понижению (Vardevanyan et al, 2001).

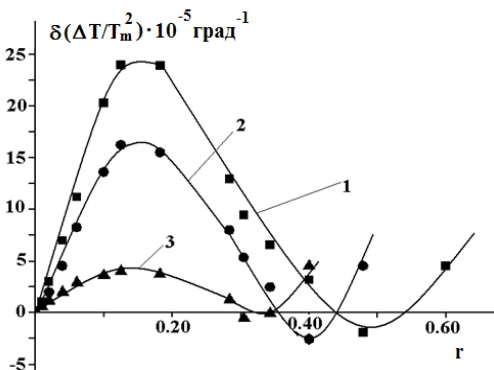


Рис. 1. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от γ комплексов БЭ-ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,01 (2) и 0,02 М (3), $pH=7.0$.

Аналогично, зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от γ , рассчитанные из экспериментальных значений ΔT ДНК и ее комплексов с БЭ (значения ΔT определены из кривых

плавления, они не приведены) также находятся в соответствии с выводами разработанной теории. Так, из рис 1. видно, что кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от g колоколообразные. Как и предсказывалось описанной выше теорией, при низких концентрациях, БЭ связывается с ДНК как скрепка, стабилизирует дц-структуру последней, за счет чего интервал плавления уширяется. При высоких концентрациях лиганда на кривых зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от g образуется максимум и эта кривая приобретает колоколообразную форму. Анализ кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от g не дает полного объяснения колоколообразной формы этой кривой с позиции существования двух способов связывания, тем более, что увеличение концентрации лиганда приводит к уменьшению значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$, т.е. к сужению ширины интервала плавления комплексов вплоть до значения, соответствующего ширине интервала плавления ДНК. Для объяснения этого эффекта необходимо учитывать, что ΔT является мерой гетерогенности энергии стекинг взаимодействий между АТ-АТ, АТ-ГЦ и ГЦ-ГЦ парами (Frank-Kamenetskii, 1971). Уменьшение ΔT указывает на то, что степень гетерогенности между этими парами понижена. Такое уменьшение гетерогенности может иметь место, если БЭ кроме интеркаляции и электростатического способа, связан с ДНК по крайней мере еще одним типом. Более того, наряду с дц-участками, этот лиганд должен связываться и с ее оц-участками, способствуя расплавлению ДНК. Это, в свою очередь, отразится на T_m и ΔT , что и наблюдается в эксперименте. Полученные теоретические и экспериментальные данные полностью подтверждают существование мультимодального взаимодействия лигандов с НК. Примечательно, что мультимодальность БЭ не зависит от ионной силы или pH раствора. Этот факт обосновывается экспериментальными исследованиями кислотной денатурации ДНК и ее комплексов с БЭ в интервале изменения $0 \leq r \leq 1$, результаты которых выявили, что БЭ с ДНК связывается несколькими способами и под влиянием pH среды. Из кривых денатурации получены значения pH_m и ΔpH по аналогии с T_m и ΔT . На основании этих величин получены зависимости δpH_m (1) и $\delta \Delta pH$ (2) от g , приведенные на рис. 2.

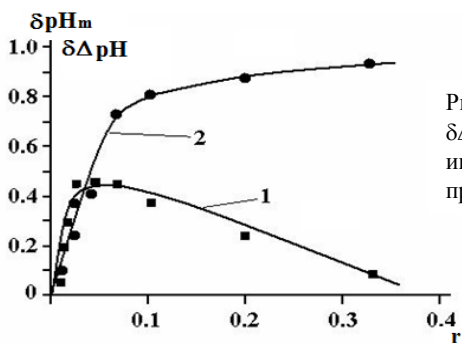


Рис. 2. Кривые зависимости $\delta \Delta pH$ (1) и δpH_m (2) от g в интервале изменения $0 \leq r \leq 1$ при $t=25^\circ C$ $\mu=2 \cdot 10^{-2} M$.

Результаты, приведенные на рис. 2 показывают, что под влиянием изменения pH в кислую сторону, зависимость $\delta \Delta pH$ от g , как и в случае термоиндуцированного перехода, имеет колоколообразную форму. Этот экспериментальный результат, следовательно, подтверждает вывод о том, что мультимодальность БЭ при

взаимодействию с ДНК практически не зависит от условий среды и проявляется также под влиянием pH.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований различными методами по взаимодействию БЭ с ДНК находятся в хорошем соответствии с данными, полученными с помощью разработанной выше теории и подтверждают ее выводы. Это указывает на то, что разработанная теория может стать фундаментом для изучения особенностей взаимодействия различных лигандов с ДНК и выявления молекулярных механизмов их связывания с ней.

Взаимодействие ДНК с неинтеркалятором Hoechst 33258. Вышеприведенные данные позволяют подтвердить, что существуют обратимо связывающиеся с ДНК соединения, которые с ней взаимодействуют несколькими способами (мультимодалные лиганды). С этой точки зрения, разработанная теория является хорошим инструментом для скрининга биологически активных веществ и выделения из них мультимодалных лигандов. Однако теория была разработана для лигандов-интеркаляторов, в то время как для желобково связывающихся веществ такая модель практически не существует. Фундаментом в этом направлении могут стать экспериментальные исследования комплексов ДНК-неинтеркаляторы на основании указанной модели. Нами, в качестве неинтеркалятора было выбрано желобково связывающееся соединение Hoechst 33258 (H33258). Плавление комплексов H33258 с ДНК проводилось при ионных силах раствора 0,002; 0,004; 0,01 и 0,02 М.

Для выяснения числа способов связывания H33258 с ДНК получены значения изменений температуры плавления и ширины интервала плавления комплексов и построены зависимости $\delta(1/T_m)$ и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от g . Кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ от g , полученные при указанных выше ионных силах раствора, возрастают при низких концентрациях лиганда и практически выходят на плато, по мере возрастания концентрации H33258 (Vardevanyan P.O. et al, JBSD, 2008). Однако, при ионной силе раствора 0,002 М, кривая зависимости $\delta(1/T_m)$ от g проявляет тенденцию к увеличению.

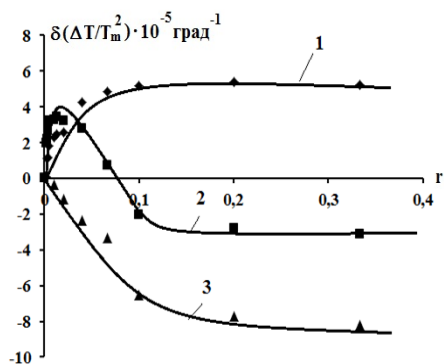


Рис. 3. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от g комплексов H33258-ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,004 (2) и 0,02 М (3), pH=7.0.

Эти результаты указывают на то, что стабилизирующий эффект H33258 на дц-ДНК (величина изменения T_m) зависит от ионной силы раствора, поскольку более существенное изменение имеет место при ионной силе 0,002 М. Эти данные указывают на то, что вклад электростатической составляющей в общую стабилизацию нативной структуры ДНК при низких ионных силах раствора существеннее

(этот лиганд также является катионом), чем при относительно больших ионных силах раствора.

Таким образом, анализ этих результатов в рамках разработанной выше теории, а также их сравнение с существующими литературными данными выявляет, что Н33258 предпочтительнее связывается с нативной ДНК. Тем не менее, более общую информацию об особенностях взаимодействия Н33258 с ДНК можно получить с помощью изменения $\delta(\Delta T/T_m^2)$ в зависимости от концентрации лиганда. Как видно из рис. 3, кривые этой зависимости, полученные при ионных силах 0,002; 0,004 и 0,02 М радикально отличаются друг от друга: при ионной силе раствора 0,002 М, кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ возрастает при низких значениях r ($0 < r \leq 0,1$) и выходит на плато при относительно больших концентрациях лиганда.

Противоположный результат получен при ионной силе 0,02 М, поскольку эта кривая, с возрастанием концентрации Н33258 уменьшается, приобретая отрицательные значения и также выходит на плато при дальнейшем увеличении концентрации лиганда. Результат, полученный при ионной силе раствора 0,02 М ожидаем, поскольку Н33258 локализуясь в малом желобке ДНК и специфически связывается с АТ парами оснований ДНК, что приводит к стабилизации этих пар и T_{AT} возрастает ($\Delta T = T_{GC} - T_{AT}$) (Frank-Kamenetskii, 1971). С этой точки зрения ход кривой 1 (рис. 3) нельзя объяснить проявлением АТ специфичности со стороны Н33258. Этот экспериментальный факт позволяет заключить, что при низких ионных силах раствора АТ специфичность Н33258 исчезнет. Полученные данные выявляют еще одну важную особенность этого лиганда. Н33258 обладает мультимодальностью при взаимодействии с ДНК (Steinmetzer, Reinert, 1998): это свойство проявляется при различных условиях среды и при постоянстве других условий раствора (температура, рН и др.), под влиянием ионной силы, этот лиганд связывается с ДНК по крайней мере двумя способами, вследствие чего кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r претерпевает гиперболическое изменение. Однако, как видно из рис. 3, кривая 2 имеет колоколообразную форму. Мы полагаем, что при ионной силе раствора 0,004 М и низких концентрациях, Н33258 с ДНК связывается неспецифически, вследствие чего $\delta(\Delta T/T_m^2)$ увеличивается. Начиная с определенных концентраций ($r \approx 0,04$) основным становится специфическое связывания с АТ последовательностями и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ начинает уменьшаться. На основании литературных, а также полученных нами данных, мы заключаем, что при низких концентрациях неспецифическое связывание Н33258 с ДНК при ионных силах раствора 0,002 и 0,004 М соответствует интеркаляционному способу (Steinmetzer, Reinert, 1998)). Увеличение ионной силы вызывает радикальное изменение механизма связывания этого лиганда сильным способом, и основным становится АТ специфичность.

Таким образом, сравнение данных по взаимодействию БЭ и Н33258 с ДНК позволяют заключить, что колоколообразное изменение $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r в случае БЭ является результатом проявления мультимодальности этого лиганда при связывании с ДНК, которое, к тому же, не зависит от факторов среды. С этой точки зрения, Н33258 нельзя считать классическим мультимодальным соединением, поскольку термодинамические параметры, определенные в рамках указанной теории и соответствующие различным способам связывания этого лиганда с ДНК, не совпадают с экспериментально полученными.

Аналогичные исследования по взаимодействию интеркалятора МС выявляют, что и в случае этого лиганда ионная сила раствора влияет на проявление присущих ему способов связывания с ДНК. При ионной силе раствора 0,02 М, МС с ДНК

взаимодействует ограниченным числом способов: наиболее вероятно, что проявляются всего два типа, при этом полная интеркаляция отсутствует. Этот факт обосновывается тем, что $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r возрастает при низких концентрациях МС и выходит на плато при относительно больших концентрациях лиганда (эта кривая по форме аналогична с кривой 1 на рис. 3 и не приводится).

Однако, при ионной силе раствора 0,002 М, кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r имеет колоколообразную форму. Фактически, при низких ионных силах раствора МС с ДНК связывается более чем двумя способами. Более того, имеет место хорошее соответствие между теоретическими и экспериментальными результатами, на основании чего мы заключаем, что МС, как и БЭ, с ДНК связывается интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим способами.

Совместное связывание различных лигандов с ДНК. Разработанная выше теория выявляет несколько способов связывания лигандов с ДНК. С этой точки зрения возникает вопрос, как будут влиять на термодинамические параметры комплексов лиганд-ДНК мультимодальные лиганды при совместном взаимодействии с ней. Для этого изучались тройные системы БЭ-ДНК-Н33258 и БЭ-ДНК-МС при двух ионных силах - 0,002 и 0,02 М. На рис. 4 представлены кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ и $\delta(1/T_m)$ от r , полученные для тройной системы БЭ-ДНК-Н33258. Из приведенного рисунка видно, что кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r в случае тройной системы БЭ-ДНК-Н33258 колоколообразная (кривая 1), в то время как при простом сложении значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$, полученных для комплексов БЭ-ДНК и Н33258-ДНК, эта кривая приобретает более сложный вид (кривая 2).

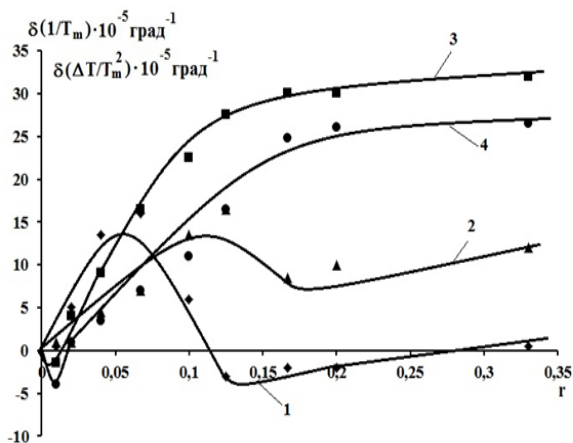


Рис. 4. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r комплексов БЭ-ДНК-Н3325 (1), БЭ-ДНК+Н3325-ДНК (2) и $\delta(1/T_m)$ от r , комплексов БЭ-ДНК-Н3325 (3), БЭ-ДНК+Н3325-ДНК (4), полученные при ионной силе раствора 0,002 М, рН=7.0.

Сравнение кривых 1 и 2 показывает, что при достаточно низких концентрациях, когда связанные молекулы обоих лигандов занимают места, достаточно удаленные друг от друга, гетерогенность тройной системы увеличивается, вследствие чего, как уже выше было показано, ΔT возрастает. Небольшое увеличение концентраций обоих лигандов приводит к конкуренции между ними, поэтому кривая 1 достигает своего максимума. Другим важным результатом является то, что $\delta(\Delta T/T_m^2)$ уменьшается в интервале $0,05 < r \leq 0,12$, затем начинает возрастать в интервале $0,12 < r \leq 0,3$. По всей

вероятности это обусловлено тем, что в этом интервале изменения γ БЭ с ДНК связывается полуинтеркаляционным способом, при этом, не только с дц-, но и с оц-участками, вследствие чего в интервале $0,05 < \gamma \leq 0,12$ $\delta(\Delta T/T_m^2)$ уменьшается до нулевого значения. Примечательно, что этот способ связывания БЭ не ингибируется со стороны Н33258. Мы предполагаем, что при совместном взаимодействии обоих лигандов, места связывания сильным способом (интеркаляционным) для них на дц-ДНК насыщаются при более низких концентрациях лигандов. Уменьшение же кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ в интервале $0,05 < \gamma \leq 0,12$ скорее всего является результатом связывания молекул БЭ с оц-участками нуклеиновой кислоты, которые не блокированы молекулами Н33258. В пользу этого указывает тот факт, что кривая 2, имея схожее с кривой 1 поведение (рис. 4), существенно отличается от последней и не понижается до нулевого значения, что указывает на то, что совместное связывание двух различных лигандов с ДНК нельзя сводить к сумме их отдельных связываний.

На это указывают и изменения кривых зависимостей $\delta(1/T_m)$ от γ (рис. 4, кривые 3 и 4). Аналогично, исследование тройной системы БЭ-ДНК-МС также выявляет, что при определенных концентрациях обоих лигандов, при их совместном связывании с ДНК возникает конкуренция между ними. Учитывая, что оба лиганда являются мультимодальными и практически одинаковыми механизмами взаимодействуют с ней, мы полагаем, что конкуренция возникает как за интеркаляционные, так и за полуинтеркаляционные места связывания, что приводит к насыщению этих мест при намного меньших концентрациях этих лигандов ($\delta(\Delta T/T_m^2)$ значительно уменьшается, кривая не приведена). Из полученных данных также выявляется, что значения $\delta(1/T_m)$, полученные для тройной системы БЭ-ДНК-МС, как и в случае БЭ-ДНК-Н33258, меньше (примерно вдвое), чем аналогичные значения, полученные при математическом сложении значений $\delta(1/T_m)$, соответствующих комплексам БЭ-ДНК и МС-ДНК.

Таким образом, при совместном взаимодействии двух различных лигандов их влияние на параметры плавления ДНК не является простой математической суммой их отдельных влияний. Более того, при определенных концентрациях этих лигандов возникает конкуренция за места связывания, что не проявляется в случаях, когда с ДНК взаимодействует мультимодальный лиганд только одного типа.

Этот вывод подтверждается результатами исследований указанных тройных систем, проведенных при ионной силе раствора 0,02 М. При достаточно низких концентрациях обоих лигандов конкуренция между ними не возникает и наблюдается синергизм их влияний, поскольку существование центров связывания интеркаляционным способом для БЭ и АТ специфичности для Н33258 в избытке приводит к возрастанию значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$. Однако, по мере увеличения концентраций обоих лигандов эти центры связывания перекрываются и интеркаляционные места для БЭ в ДНК блокируются (возникает конкуренция вследствие того, что константа связывания Н33258 примерно на порядок больше, чем константа интеркаляционного связывания БЭ). Это приводит к уменьшению ΔT тройной системы и значения $\delta(\Delta T/T_m^2)$ становятся отрицательными, однако в этих условиях препятствий для полуинтеркаляции молекул БЭ в дс- или оц-участки ДНК нет, вследствие чего при относительно больших концентрациях обоих лигандов кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от γ стремится к нулевому значению (как и кривая 3 на рис. 4.)

Приведенные выше выводы подтверждаются и в случае совместного взаимодействия БЭ и МС с ДНК при ионной силе раствора 0,02 М. Кривые

зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (кривая 1) и $\delta(1/T_m)$ (кривая 2) от r (рис. 5) качественно отличаются от таковых, соответствующих комплексам БЭ-ДНК и МС-ДНК.

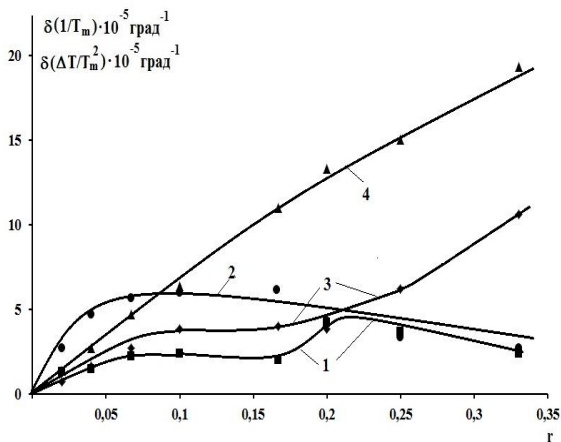


Рис. 5. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r тройной системы БЭ-ДНК-МС (1), БЭ-ДНК+МС-ДНК (2) и $\delta(1/T_m)$ от r тройной системы БЭ-ДНК-МС (3), БЭ-ДНК+МС-ДНК (4), полученные при ионной силе раствора 0,02 М, рН=7.0.

Более того, представляющие математическую сумму кривые зависимостей $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (кривая 2) и $\delta(1/T_m)$ (кривая 4) также отличаются от кривых тех же зависимостей, соответствующих тройной системы БЭ-ДНК-МС (кривые 1 и 3 соответственно). Ход кривой 1 (рис. 5) намного эффективнее визуализирует конкурентное взаимодействие БЭ и МС с ДНК, особенно при их средних концентрациях. Это подтверждается и поведением кривой зависимости $\delta(1/T_m)$ (рис. 5, кривая 3). Ход кривых зависимостей $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (кривая 1) и $\delta(1/T_m)$ (кривая 3) от r , соответствующих тройной системе БЭ-ДНК-МС полностью подтверждает вывод существования конкуренции между обоими интеркаляторами (Vardevanyan P.O. et al, 2013), что, однако не наблюдается на эксперименте при отдельном взаимодействии каждого из этих лигандов с ДНК.

Таким образом, на основании экспериментальных данных по плавлению тройной системы БЭ-ДНК-Н33258 можно заключить, что случае совместного взаимодействия классического интеркалятора БЭ и классического неинтеркалятора Н33258 или интеркаляторов БЭ и МС с ДНК, определяющее влияние на способы их связывания имеет ионная сила раствора. При этом, совместное взаимодействие двух различных лигандов (интеркалятора и неинтеркалятора, или двух интеркаляторов) с ДНК не является простой суммой их отдельного связывания. Более того, при их совместном взаимодействии с ДНК возникает конкуренция между ними. Эти результаты также подтверждают вывод теории, что совместное взаимодействие двух различных мультимодальных лигандов с ДНК не является результатом связывания по крайней мере двумя способами одного типа лиганда.

Результаты экспериментальных исследований комплексов ДНК с двумя различными лигандами выявляют также, что непосредственное связывание любого лиганда с ДНК оставляет обособленное влияние на ее термодинамические характеристики, однако совместное связывание двух (и, по всей вероятности, больше) различных лигандов не является простой суммой таких влияний. Более того, в определенной степени, совместное влияние двух лигандов на термодинамические

характеристики перехода спираль-клубок ДНК можно рассмотреть как влияние «обобщенного» лиганда, который проявляет присущие ему свойства.

Также очевидно, что длинная полимерная цепь ДНК действует как одно целое, поскольку даже при незначительных концентрациях двух различных лигандов, когда молекулами этих веществ заполняются участки, достаточно удаленные друг от друга, она ведет себя не так, как в случае связывания с отдельными из них при таких же концентрациях.

Этот факт может разъяснить некоторые вопросы, связанные с регуляцией функционирования ДНК (инициация, ингибирование, экспрессия генов) в клетке. Тем не менее, полученные данные не претендуют на абсолютность, поскольку нельзя исключить аддитивное влияние двух различных лигандов на параметры конформационных переходов ДНК, что также может иметь определенное биологическое значение для регулирования функционирования ДНК.

Термодинамика взаимодействия ДНК с лигандами. Приведенные выше экспериментальные данные подтверждают основные выводы разработанной теории для мультимодального взаимодействия классического интеркалятора БЭ, а также других соединений, в частности неклассического интеркалятора МС или желобково связывающегося лиганда Н33258. Эта теория позволяет выявить не только различные способы связывания лигандов с ДНК, но и определить значения параметров связывания (константы K , а также число оснований ДНК n , приходящих на одно место связывания). Для сравнения теоретически рассчитанных значений K и n с экспериментальными, мы использовали предложенный Скетчардом метод анализа данных по взаимодействию лигандов с макромолекулами. Известно, что в случае существования одного способа связывания эти кривые прямолинейные, в случае же существования более одного способа – непрямолинейные (Нечипуренко, 2015).

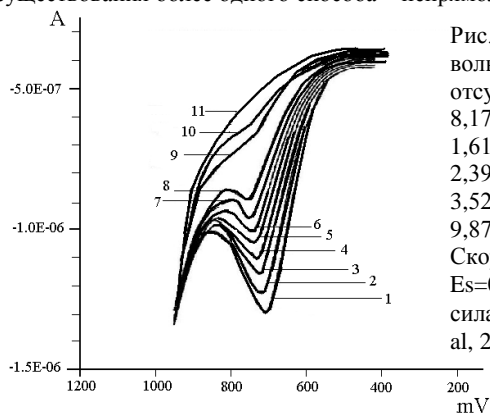


Рис. 6. Дифференциальная импульсная вольтаммограмма $1,162 \cdot 10^{-5}$ М БЭ в отсутствие (1) и присутствии (2) $8,17 \cdot 10^{-6}$ М; (3) $1,218 \cdot 10^{-5}$ М; (4) $1,612 \cdot 10^{-5}$ М; (5) $2,001 \cdot 10^{-5}$ М; (6) $2,390 \cdot 10^{-5}$ М; (7) $2,775 \cdot 10^{-5}$ М; (8) $3,526 \cdot 10^{-5}$ М; (9) $6,022 \cdot 10^{-5}$ М; (10) $9,874 \cdot 10^{-5}$ М; (11) $1,531 \cdot 10^{-4}$ М ДНК. Скорость сканирования - 20 мВ сек^{-1} . $E_s = 0,3 \text{ В}$ импульса - 100 мВ . Ионная сила раствора - $\mu = 0,02 \text{ М}$ (Minasyan et al, 2006).

Приведенные на рис. 8 кривые 1 и 2 различаются: наклон кривой (2) меньше, чем наклон кривой (1), при этом, последняя непрямолинейная (кривая 4 является продолжением кривой 1). Кривая же 2 прямолинейная (она обусловлена интеркаляционным способом связывания БЭ с дц-ДНК). Как уже отмечалось, многие лиганды с ДНК связываются более чем одним способом, поэтому кривые их связывания с ДНК в координатах Скетчарда становятся нелинейными. В этом случае, для экспериментального установления различных способов взаимодействия мультимодальных лигандов (в том числе БЭ) с ДНК информативным является

сочетание различных или применение более чувствительных методов исследования, поскольку различные способы связывания лиганда с ДНК будут отражаться на физические характеристики образовавшихся комплексов. Исходя из этого, нами были применены спектроскопические (абсорбционная, флуоресцентная) и менее распространенные электрохимические (дифференциальная импульсная вольтамперометрия – ДИВ, квадратно-волновая вольтамперометрия - КВВ) методы для определения числа способов связывания БЭ (а также другого интеркалятора МС и неинтеркалятора Н33258) с ДНК.

На рис. 6 приведены ДИВ БЭ в отсутствие (кривая 1) и присутствии ДНК (кривые 2-11). На основании анализа ДИВ, а также спектров поглощения (рис. 7 А) и флуоресценции (рис 7 Б) комплексов БЭ-ДНК построены изотермы адсорбции в координатах Скотчарда (рис. 8) (Vardevanyan et al, 2003; Minasyan et al, 2006; Vardevanyan et al, 2012).

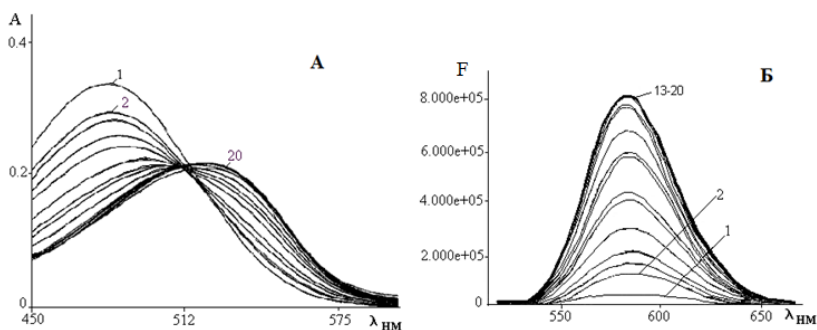


Рис. 7. А. Спектры поглощения чистого БЭ (1) и его комплексов с дц-ДНК (2-20) в интервале изменения $\gamma_b - 0 \leq \gamma \leq 1,0$ при $pH=7,0, t=25^{\circ}C, \mu = 2,0 \cdot 10^{-2}M$ (б).

Б. Интенсивность флуоресценции чистого БЭ (1) и его комплексов с дц-ДНК (2-20) в интервале изменения $\gamma_b - 0 \leq \gamma \leq 1,0$ при $pH=7,0, t=25^{\circ}C, \mu = 2,0 \cdot 10^{-2}M$ (Vardevanyan P.O., et al, 2003).

При интеркаляции в плоскость между парами оснований, молекулы лиганда экранируются от тушителей флуоресценции (в данном случае молекул воды и растворенного кислорода), вследствие чего интенсивность флуоресценции этих молекул увеличивается (Vardevanyan et al, 2003). Необходимо отметить, что в области насыщения этих мест связывания кривая 2 не отклоняется от прямолинейности и является результатом проявления одного способа связывания. Поскольку кривая 1 непрямолинейная и различается от кривой 2, мы полагаем, что молекулы БЭ, кроме интеркаляционного, связаны с дц-ДНК другим способом (или другими способами), которые однако нефлуоресцируют. Это отражается на кривой связывания, которая получена на основании анализа абсорбционных данных. Фактически кривая 1 на рис. 8 отражает сумму различных способов связывания, следовательно, вычитанием кривую 2 из кривой 1 количественно можно оценить величины параметров связывания нефлуоресцирующих комплексов. Таким образом была получена кривая 3, которая соответствует нефлуоресцирующим комплексам БЭ с ДНК. Нелинейность кривой 3 позволяет заключить, что на ДНК образуются по крайней мере два типа

нефлуоресцирующих комплексов – сильный, соответствующий полуинтеркаляционному способу и слабый. Кривая 4 является результатом более слабого типа взаимодействия БЭ с ДНК и, по всей вероятности, соответствует электростатическому механизму, так как проявляется при высоких концентрациях лиганда.

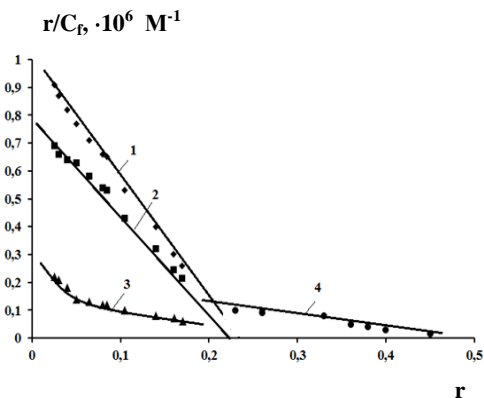


Рис. 8. Изотермы адсорбции БЭ на дц-ДНК в координатах Скетчарда. Кривая 1 получена на основании абсорбционных, кривая 2 – флуоресцентных данных. Эти кривые соответствуют интеркаляционному способу связывания. Кривая 3 получена вычитанием кривой 2 из кривой 1 и соответствует полуинтеркаляционному и более слабому, кривая 4 – электростатическому способам связывания.

Учитывая, что БЭ с дц-ДНК связывается несколькими способами, графики Скетчарда были анализированы линеаризованным уравнением, предложенном в (Arakelyan et al, 2000), которая в дальнейшем была преобразована в (Vardevanyan et al, 2014), для определения не только значений K и n , но и доли связанных данным типом молекул лиганда из общего количества связанных молекул. Анализ данных по этой модели позволяет выделить три способа связывания БЭ с дц-ДНК – интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический и оценить значения параметров для них - $K_s^1 \approx 200 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_s^1 \approx 6$; $K_s^2 \approx 25 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_s^2 \approx 4$ и $K_w \approx 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_w \approx 1,5$, где K_s^1 соответствует константе интеркаляционного, K_s^2 – полуинтеркаляционного, K_w – слабого способов связывания. Увеличение интенсивности флуоресценции БЭ обусловлено интеркаляцией молекул лиганда в плоскость между парами оснований ДНК (Тищенко и др., 1996). Нефлуоресцирующий сильный комплекс соответствует полуинтеркаляционному способу, поэтому молекулы БЭ становятся доступными для молекул воды, вследствие чего имеет место тушение флуоресценции. При этом, этот тип связывания проявляется в условиях заполнения интеркаляционных мест связывания, что позволяет допустить, что полуинтеркаляция должна реализовываться со стороны большого желобка в ГЦ богатых участках (Тищенко и др., 1996).

Исследования методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии указывают на то, что значения K в случае связывания БЭ с ДНК различного ГЦ содержания, полученные для интеркаляционных и полуинтеркаляционных комплексов, практически не зависят от среднего ГЦ-содержания. Однако, из данных табл. 1 выявляется, что значения n проявляют некоторую зависимость от ГЦ-содержания, поскольку имеет место монотонное уменьшение этого параметра, когда среднее ГЦ содержание приближается к 100%, что отражает некоторую предпочтительность БЭ к этим парам при полуинтеркаляции (Vardevanyan et al, 2012).

Таблица 1

Значения K и n при интеркаляционном и полуинтеркаляционном способах связывания БЭ с ДНК различного ГЦ-содержания, при ионной силе раствора $2.0 \cdot 10^{-2}$ М, $pH \approx 7.0$.

Способ связывания	ДНК			
	Poly[d(A-T)] ₂	Cl. perfr.	Тимус теленка	M. lysod.
	$K; 10^5 \text{ M}^{-1}$			
Интеркаляция	18,0±2,0	18,0±2,0	20,0±2,0	19,0±2,0
Полуинтеркаляция	1,8±0,5	2,1±0,5	2,4±0,5	2,4±0,5
n				
Интеркаляция	6,0	6,0	6,0	6,0
Полуинтеркаляция	5,0	5,0	4,0	3,0

Таким образом, основываясь на полученные данные можно утверждать, что при интеркаляции БЭ не проявляет специфичность к определенным нуклеотидным парам, в то время как при полуинтеркаляционном способе нуклеотидная последовательность играет важную роль при насыщении этих мест связывания.

Оценены также термодинамические параметры связывания БЭ с одноцепочечной ДНК при различных условиях (высокая температура, pH) (Вардеванян и др. 2003). Ранее, взаимодействие БЭ и других интеркаляторов с оц-НК рассматривалось с точки зрения существования дц-участков в них и считалось, что эти лиганды интеркалируют в дц-участки этих НК или связываются электростатически с фосфатными группами. В этих исследованиях не принимался во внимание тот факт, что возможна частичная интеркаляция ароматических лигандов в плоскость между парами оснований оц-НК. Проведенные нами исследования выявили, что БЭ с оц-ДНК связывается по крайней мере двумя способами, вследствие чего кривые связывания становятся непрямолинейными (эти кривые по форме аналогичны кривой 3, рис. 8, кривые не приводятся). С помощью уравнений, приведенных в работе (Vardevanyan et al, 2014) рассчитаны значения K и n для, по крайней мере, для двух способов связывания и проведено сравнение полученных данных с теоретическими. Учитывая долю связанных различными способами молекул БЭ с оц-полинуклеотидами были получены следующие значения: $K_1 \approx 2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $n_1 \approx 2,0$ $K_2 \approx 5,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_2 \approx 4,0$, $p = 0,35$. Одним из важных результатов проведенных теоретических и экспериментальных исследований заключается в том, что как в случае дц-, так и в случае оц-ДНК получаются хорошо согласующиеся данные для термодинамических параметров связывания БЭ с ДНК, которые обобщены в таблице 2.

Таким образом, результаты термодинамических исследований по взаимодействию БЭ с дц- и оц- ДНК также выявляют хорошее соответствие с теоретически рассчитанными и подтверждают ее выводы, в частности, существование нескольких способов связывания БЭ с различными конформациями ДНК. Эти данные также обосновывают вывод о том, что мультимодальное связывание одного типа лиганда не является суммой связывания только одним способом двух или больше различных лигандов с ДНК.

Таблица 2

Термодинамические параметры связывания БЭ с дц- и оц- ДНК сильным способом при $pH \approx 7,0$ и ионной силе раствора $0,02M$.

$T, ^\circ C$	$K_1, 10^5 M^{-1}$	n_1	$\Delta G,$ ккал/моль	$\Delta H,$ ккал/моль	$\Delta S,$ кал/моль·К
дц-ДНК					
20	20,0±0,5	6	-(8÷9)±0,5	-5,0±0,5	31,8±0,5
40	15,0±0,5	6	-(8÷9)±0,5	-5,0±0,5	29,5±0,5
50	10,0±0,5	6	-(8÷9)±0,5	-5,0±0,5	27,3±0,5
оц-ДНК					
70	1,0±0,5	2	-(9÷10)±0,5	-	-

Взаимодействие интеркалятора метиленового синего с ДНК. Результаты плавления комплексов ДНК с МС и их сопоставление с данными приведенной выше теории, выявляют мультимодальный характер связывания этого лиганда с ДНК. Литературные данные указывают на то, что, благодаря планарной структуре, МС связывается с ДНК интеркаляционным механизмом и этот факт не стал предметом дискуссии. Однако, приведенные нами выше экспериментальные данные ставят под сомнение факт обязательного проявления интеркаляции МС в дц-ДНК. Следовательно, несмотря на принадлежность этого лиганда к классу интеркаляторов, требуются комплексные подходы для выяснения механизмов связывания, поскольку, существующие в литературе данные полностью не проливают свет на эти вопросы (Nafisi et al, 2007; Hossain et al, 2008; Rohs and Sklenar, 2004).

Экспериментальные данные вместе с результатами плавления этих комплексов позволяют уточнить некоторые вопросы о механизмах связывания. С этой точки зрения необходимо отметить, что МС обладает нестандартной флуоресцентной особенностью: во первых, этот лиганд поглощает при длине волны 664 нм, флуоресцирует при 683 нм (Changlun et al, 2010). Во вторых, при возбуждении при 290 нм (максимум поглощения МС в УФ области), на спектрах флуоресценции образуются два пика в интервале длины волны 300-800 нм (в случае других катионных интеркаляторов (БЭ, АО, ПФ) такой эффект не обнаруживается). Более того, по сравнению с указанными интеркаляторами, интенсивность флуоресценции МС в водной среде значительно выше в свободном состоянии. Этот эффект не объясняется теорией флуоресценции (Lakowicz, 2006) и не находится в соответствии с аналогичными данными, полученными для комплексов ДНК с другими интеркаляторами (БЭ, акридиновый оранжевый – АО и др.) (Vardevanyan et al, 2003). Исходя из этого нами возбуждение проводилось при длине волны поглощения этого лиганда в УФ области, с целью обнаружения пиков, соответствующих интеркалированным молекулам МС, если полная интеркаляция в дц-ДНК осуществляется и если такие пики образуются. Оказалось, что МС имеет максимум флуоресценции и при длине волны 583 нм, что не проявляется при регистрации его спектра флуоресценции в интервале $600 \leq \lambda \leq 800$ нм (рис. 9). Из полученных спектров выявилось, что, по мере увеличения концентрации дц-ДНК в растворе интенсивность флуоресценции при 583 нм возрастает, что соответствует эффекту, обнаруженному

для других интеркаляторов. В случае АО, являющимся структурным аналогом МС, (АО отличается от МС отсутствием атома серы в сердцевине акридиновой группы) аналогичный эффект не обнаруживается.

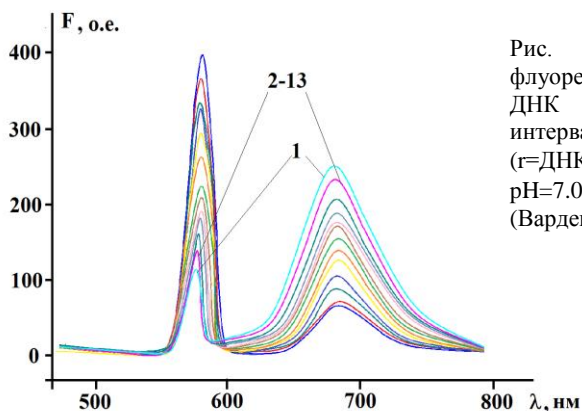


Рис. 9. Интенсивность флуоресценции МС (1) и МС-ДНК комплексов (2-13) в интервале изменения τ (τ =ДНК/МС) - $0 \leq \tau \leq 20,0$ при $pH=7,0$, $t=25^{\circ}C$, $\mu=2,0 \cdot 10^{-2}M$ (Вардеванян и др., 2013).

На основании вышеприведенного мы полагаем, что уменьшение интенсивности флуоресценции МС при 682 нм в результате связывания с ДНК может быть обусловлено неполной интеркаляцией, вследствие чего энергия возбуждения молекул лиганда частично теряется вследствие тушения полярными молекулами их окружения (воды и растворенного в ней кислорода). На основании анализа абсорбционных и флуориметрических исследований, получены параметры связывания МС с дц-ДНК. Изотерма адсорбции Скотчарда, описывающая взаимодействие, как и в случае БЭ, непрямолинейная (см. рис. 8, кривая 1): на кривой образуются два прямолинейных участка, проявление которых обусловлено двумя способами связывания МС с ДНК. Значения K и n характеризующие сродство МС с ДНК, оценены при ионных силах раствора 0.002 и 0.02 М и обобщены в таблице 3.

Таблица 3

Значения K и n при связывании МС с ДНК при различных ионных силах раствора.

Способ связывания	$K; 10^5 M^{-1}$		n (на основании)	
	Ионная сила раствора			
	0,002 М	0,02 М	0,002 М	0,02 М
Интеркаляционный	$15,0 \pm 0,5$	-	$5,0 \div 6,0$	-
Полуинтеркаляционный	$7,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$2,0 \div 3,0$	4,0
Электростатический	$0,2 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,05$	1,5	2

Сравнение значений параметров K и n , рассчитанных с помощью разработанной теории и полученные экспериментально, выявляет хорошее соответствие в случае,

если принимается существование всего двух способов связывания МС с ДНК при ионной силе раствора 0,02 М. При этом, соответствие между теорией и экспериментом наблюдается для случая полуинтеркаляционного и электростатического способов связывания МС с дц-ДНК.

Полученные при ионной силе раствора 0,002 М данные выявляют хорошее соответствие между экспериментом и теорией в случае существования трех способов связывания (табл. 3). Экспериментальные результаты подтверждают тот факт, что разработанная выше теория является хорошим инструментом для выявления особенностей связывания различных лигандов с ДНК и позволяет выяснить молекулярные механизмы взаимодействия.

Так, анализ результатов экспериментально полученных данных по взаимодействию МС с ДНК на основании теории позволяют сделать следующие заключения: полуинтеркаляционный способ связывания этого лиганда с ДНК можно считать универсальным; проявление интеркаляционного способа зависит от ионной силы раствора и этот фактор является определяющим для проявления мультимодальности при взаимодействии МС с ДНК. Кроме указанных способов, МС связывается также электростатически с фосфатными группами ДНК.

Полученные данные также указывают на отсутствие специфичности МС к АТ парам оснований. Более того, этот лиганд проявляет некоторую предпочтительность к ГЦ парам при полуинтеркаляционном способе связывания.

Взаимодействие неинтеркалятора Hoechst 33258 с ДНК. Вышеприведенные данные, полученные для комплексов ДНК с классическим интеркалятором БЭ или неклассическим интеркалятором МС, выявляют хорошее соответствие с данными вышеприведенной теории. Эта теория замечательна тем, что позволяет определить число способов связывания лиганда с ДНК, выделить среди многочисленных соединений мультимодальные вещества в отдельный подкласс и вычислить термодинамические параметры комплексообразования этих веществ с синтетическими и природными НК.

Однако, хорошее соответствие между теорией и экспериментом получено в случае лигандов-интеркаляторов. С этой точки зрения, область применения данной теории к лигандам можно определить в том случае, если получены экспериментальные данные по взаимодействию неинтеркаляторов с ДНК и анализированы с помощью этой теории. Очевидно, что в случае соответствия между экспериментом и теорией, последняя приобретет более широкое применение. С этой целью в данной работе приводятся данные также по комплексообразованию Н33258 с ДНК. Термодинамические параметры связывания К и n при взаимодействии Н33258 с ДНК оценены при ионных силах раствора 0,002; 0,004; 0,01 и 0,02 М методами абсорбционной, флуоресцентной спектроскопии, а также квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВ). Как и в случае комплексообразования МС, при взаимодействии Н33258 с ДНК изотермы адсорбции в координатах Скетчарда, полученные на основании анализа спектров флуоресценции и поглощения, при низких заполнениях (в области малых значениях τ , соответствующих сильному (специфическому) типу связывания), совпадают друг с другом, что указывает на отсутствие еще одного, скрытого способа связывания. Однако, изотермы адсорбции, представленные на рис. 10, как и ожидалось, непрямолинейные, что объясняется проявлением сильного и слабого типов взаимодействий.

Из кривых связывания Н33258 с ДНК выявляется согласующаяся с данными плавления особенность: ионная сила раствора существенно влияет на средство этого

лиганда с НК. Можно полагать, что этот фактор, при прочих равных условиях является главной движущей силой комплексообразования и, по всей вероятности, обуславливает степень вклада водородных связей, гидрофобных, а также ван-дер-Ваальсовых взаимодействий в образование комплексов. На это указывает то, что кривая 1 сильно отличается от остальных кривых, поскольку имеет большой угол наклона при низких заполнениях. Из кривых связывания вычислены значения K и n , которые представлены в табл. 4. Большой наклон кривой 1 при низких значениях g указывает на то, что значение K_s , полученное при ионной силе раствора 0,02 М, значительно больше, чем полученные значения этого параметра при ионных силах 0,01 и 0,002 М, и на два порядка больше, чем значение, полученное при 0,004 М.

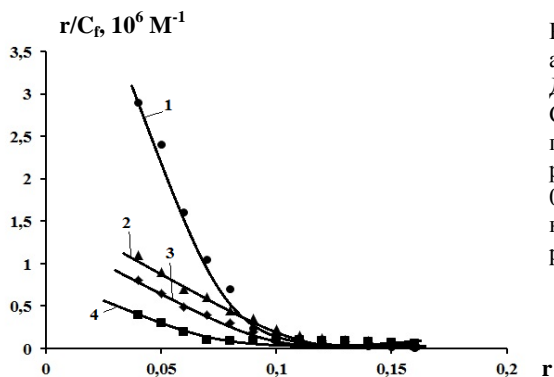


Рис. 10. Изотермы адсорбции Hoechst 33258 с ДНК в координатах Скетчарда. Кривая 1 получена при ионной силе раствора 0,02; кривая 2 – 0,01; кривая 3 – 0,04; кривая 4 – 0,002 М, рН=7,0, $t=25$ °С.

Близкие значения K_s получены при ионных силах раствора 0,002 и 0,01М, несмотря на то, что механизмы связывания Н33258 с ДНК при этих ионных силах раствора различны (см. результаты плавления). Увеличение ионной силы раствора вдвое приводит к резкому возрастанию величины K_s . Возможно, существует критическое значение ионной силы раствора, выше которого степень сродства Н33258 к ДНК значительно усиливается. Этот факт может быть следствием того, что при относительно низких ионных силах структура ДНК более «открытая» и гидратированная, вследствие чего гидрофобность малого желобка, а также геометрическое соответствие между этим желобком и молекулой Н33258 уменьшены.

Несколько неожиданным является результат, полученный при ионной силе раствора 0,004 М: значение K_s на порядок меньше, чем при ионных силах раствора 0,002 и 0,01 М. Как было показано выше, Н33258 может связываться с ДНК интеркаляционным механизмом (преимущественно в ГЦ богатых участках, см. (Ismail et al, 2000; Kakkar et al, 2005)). Полученные результаты плавления комплексов при 0,002 М также указывают на этот способ связывания при низких концентрациях Н33258. При этом, кривая связывания, полученная из абсорбционных и флуориметрических исследований указывает на существование двух способов, следовательно, при низких ионных силах проявляются сильный (интеркаляционный) и слабый (электростатический) способы связывания.

Это позволяет с большой уверенностью утверждать, что при ионной силе раствора 0,004 М уменьшение значения K обусловлено двумя способами связывания - интеркаляция в ГЦ-богатые участки со стороны большого желобка и АТ специфическое связывание в малом желобке. Вследствие этого возникают силы,

взаимно ослабляющие эти способы: при интеркаляции спираль ДНК претерпевает значительные структурные перестройки из-за существования значительной гибкости. С другой стороны, локализация молекул Н33258 в малом желобке и блокирование АТ богатых участков приводит к образованию «жестких» и «исключенных» для связывания участков в ДНК, вследствие чего и' интеркаляция, и' желобковое связывание затрудняются, что отражается на параметры плавления.

Таблица 4.

Зависимость значений К и n комплексов Hoechst 33258 с ДНК от ионной силы раствора

Ионная сила раствора, М	$K_s; 10^6 \text{ M}^{-1}$	$K_w; 10^6 \text{ M}^{-1}$	n_s	n_w
0,002	7,90±0,5	1,4±0,5	5,5	3,0
0,004	0,60±0,05	0,9±0,05	4,0	3,3
0,010	9,50±0,5	1,5±0,05	5,5	3,5
0,020	55,0±0,5	1,5±0,05	6,0	3,6

Индексом “s” (strong) обозначен сильный, “w” (weak) – слабый тип связывания.

С другой стороны, при слабом способе связывания значения К практически не отличаются друг от друга. Мы полагаем, что полученные при различных ионных силах раствора близкие значения K_w указывают на один и тот же механизм связывания Н33258 с ДНК, при этом, в интервале от 0,002 М до 0,02 М ионная сила раствора существенно не влияет на этот способ. Наиболее вероятным является электростатическое взаимодействие лиганда с внешней стороны спирали ДНК с фосфатными группами. Обычно, для исключения электростатического способа связывания требуются более высокие ионные силы (>0,1 М), в то время как для реализации этого способа структурные перестройки спирали ДНК не могут быть определяющими и не могут препятствовать его проявлению.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что желобково связывающийся лиганд Н33258 также, как и классический интеркалятор БЭ и неклассический интеркалятор МС проявляет мультимодальность при взаимодействии с ДНК. Полученные различными экспериментальными методами данные указывают на то, что этот лиганд, помимо электростатического и специфического связывания в малом желобке ДНК с АТ парами, при низких ионных силах раствора взаимодействует интеркаляционным способом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана теория кооперативных переходов комплексов ДНК с мультимодальными лигандами, в которой учитывается возможность одновременного образования произвольного числа типов комплексов с различными формами ДНК. Теория позволяет выявить различные способы связывания мультимодальных лигандов с дц- и оц-ДНК и теоретически рассчитать термодинамические параметры для этих способов, а также таких экспериментально наблюдаемых величин, как

степень денатурации и корреляционная длина в зависимости от концентрации лигандов. Одним из важных выводов теории является то, что мультимодальное взаимодействие одного типа лиганда с ДНК не является суммой связывания только одним способом двух или больше различных лигандов.

Анализ данных по взаимодействию различных лигандов с ДНК с помощью разработанной теории позволяет также выявить, при каких условиях данный лиганд проявляет или не проявляет мультимодальность. Так, полученные в данной работе результаты экспериментальных исследований выявляют, что БЭ являясь классическим интеркалятором, может считаться также классическим мультимодальным лигандом, поскольку проявление выявленных способов связывания этого лиганда с ДНК не зависит как от ионной силы, так и от pH раствора. Более того, БЭ, при взаимодействии с ДНК, проявляет мультимодальность и в присутствии других, конкурентных с ним лигандов.

Аналогичный анализ, проведенный в случае взаимодействия МС с ДНК указывает на то, что мультимодальность этого лиганда обуславливается факторами среды, в частности, ионной силой раствора, поскольку при низких ионных силах проявляет истинную мультимодальность, в то время как при относительно больших ионных силах проявляются не все способы связывания этого лиганда с ДНК. Этот факт важен, поскольку МС считается интеркалятором и принимается, что один из механизмов его связывания – интеркаляция. Как показали наши исследования, на самом деле основным для этого лиганда является полуинтеркаляционный способ. МС обладает также некоторыми особенностями, в частности флуоресцентные свойства этого лиганда отличаются от тех же характеристик других интеркаляторов. Тем не менее, сравнение теоретических и экспериментальных данных по взаимодействию МС с ДНК позволяют отнести этот лиганд в подкласс мультимодальных.

То же самое нельзя сказать в случае неинтеркалятора, желобково связывающегося соединения Н33258, поскольку, несмотря на то, что при определенных условиях этот лиганд может с ДНК связываться двумя противоположными механизмами, которые обуславливают колоколообразное изменение ширины интервала плавления комплексов. В то же время, сравнение теоретически рассчитанных и экспериментально определенных значений термодинамических параметров не выявляет соответствие, что указывает на то, что комплексообразование Н33258 с ДНК не описывается разработанной теорией.

Таким образом, проведенные теоретические и экспериментальные исследования позволяют выявить некоторые особенности связывания различных лигандов с ДНК. Эти данные дают основания заключить, что разработанная теория может служить фундаментом в исследованиях по взаимодействию лигандов с ДНК. Полученные данные также могут стать основой для скрининга широкого набора биологически активных веществ, имеющих прикладное значение.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная теория позволяет путем сравнения с экспериментом установить особенности связывания мультимодальных лигандов с дц- и оц- ДНК. Полученные в теории уравнения позволяют на основании экспериментально измеряемых параметров плавления комплексов ДНК с лигандами проводить полный термодинамический анализ и предсказать существование различных способов связывания.
2. Разработанная теория констатирует, что изменение ширины интервала плавления ($\delta(\Delta T/T_m^2)$) комплексов ДНК может иметь колоколообразную форму в случае мультимодального связывания лиганда с дц- и оц-ДНК. Колоколообразная форма кривой этой зависимости обосновывается в случае классического интеркалятора БЭ. Проявление нескольких способов связывания этого лиганда с ДНК не зависит от ионной силы и pH раствора и обнаруживается с помощью различных методов исследования, что указывает на универсальность механизмов связывания этого лиганда.
3. Анализ данных по взаимодействию МС с ДНК, в рамках разработанной теории, позволил обнаружить неизвестный до сих пор еще один способ: кроме общепринятого интеркаляционного, этот лиганд связывается также полуинтеркаляционным способом.
4. Желобково связывающийся лиганд Н33258 при низких ионных силах раствора ($\mu \leq 0,002$ М) интеркалирует в ДНК, а при относительно больших ионных силах ($\mu > 0,004$ М) основным становится АТ специфическое связывание. При увеличении концентрации лиганда, когда все доступные места для сильного типа взаимодействия заполнены, обнаруживается дополнительный, электростатический способ связывания с фосфатными группами ДНК.
5. Обнаружено, что при ионной силе раствора $\mu = 0,004$ М Н33258 связывается с дц-ДНК двумя различными сильными механизмами - интеркаляционным и АТ специфическим. Проявление одновременно двух сильных способов связывания приводит к увеличению мест связывания и дополнительной стабилизации дц-структуры ДНК.
6. Сравнение теории с экспериментом обнаружило важный факт: при совместном взаимодействии классического интеркалятора БЭ и классического неинтеркалятора Hoechst 33258, а также двух интеркаляторов БЭ и МС с ДНК, обобщенное влияние на параметры перехода спираль-клубок не является суммой их отдельных влияний на эти же параметры.
7. Совокупность полученных данных является экспериментальным подтверждением теоретического вывода о том, что совместное взаимодействие различных мультимодальных лигандов с ДНК нельзя сводить ко взаимодействию одного лиганда с ней несколькими способами. В присутствии других мультимодальных лигандов сохраняется способность мультимодального связывания БЭ с ДНК, что не зависит от ионной силы раствора.
8. В случае классического неинтеркалятора Н33258 или неклассического интеркалятора МС, изменение ионной силы приводит к изменению способов их связывания с ДНК как в отсутствие, так и в присутствии других лигандов.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian A.P., Vardevanian P.O., Antonyan A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetski M.D. // Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single stranded DNA. *J. of Biomol. Struct. and Dyn.*, 1996, v. 14, N 2, p. 275-283.
2. Antonyan A.P., Vardevanyan P.O., Terzikian G.A., Karapetian A.T., Borisova O.F. // Heterogen complexes of Ethidium Bromide and their role in stabilisation of helix DNA. Abstracts: Tenth Conversation, Albany USA, in *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, v. 14, N 6, 1997, p. 918.
3. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Antonyan A.P., Vardevanyan P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Theoretical and experimental investigations of the conformational transitions of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites of different forms of DNA. In *Struture, Moution, Interaction and Expression of Biological Macromolecules Proc. of the 10-th Coversation. Adenine Press., N.Y, 1998, p. 259-266.*
4. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т. Щелкина А.К., Борисова О.Ф. // Связывание бромистого этидия с нативным и денатурированным poly(dA)-poly(dT). *Молекулярная биология*, 2000, т. 34, N 2, с. 310-315.
5. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukian G.A., Karapetian A.T. // Study of Ethidium Bromide Interaction Peculiarities with DNA. *Experimental and Molecular Medicine*, 2001, v. 33, N4, p. 205-208.
6. Antonyan A.P., Vardevanyan P.O., Karapetian A.T. // pH-Induced Helix – Coil Transition of EtBr-DNA Complexes. Abstract 12th Conversation, 2001, Albany, USA, *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, v. 12, N 6, p. 917-918.
7. Антонян А.П., Вардеванян П.О., Карапетян А.Т. // Взаимодействие БЭ с оц-ДНК под воздействием различных факторов окружающей среды. Тезисы II международного симпозиума “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии”, 29-31 мая, Дубна, 2001, с. 58.
8. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Minasbekyan L.A., Karapetian A.T. // Some aspects of DNA-EtBr Interaction Peculiarities. “The Genome and Beyond – Genomics and Structural Biology for Medicine”, Miami, 2002, Feb, 2-6.
9. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. // The Binding of Ethidium Bromide with DNA: Interaction with Single- and Double-Stranded Structures. *Experimental and Molecular Medicine*, 2003, v. 35, N6, pp. 527-533.
10. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Давтян А.Г., Мурадян А.М., Навасардян Л.А., Карапетян А.Т. // Особенности комплексообразования бромистого этидия с ДНК. Роль биологически активных веществ в интегративной деятельности организма в норме и в процессе формирования общеадаптационного синдрома. Материалы международной конференции, ЕрМи, 2004, с. 21.
11. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Давтян А.Г., Аракелян А.В., Минасян С.Г., Тавадян Л.А. // Применение метода дифференциальной импульсной вольтамперометрии в исследовании комплексов БЭ с ДНК. *Биофизика*, 2005, т. 50, N 2, с. 371-373.

12. Minasyan S.G., Tavadyan L.A., Antonyan A.P., Davtyan H.G., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. // Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. *Bioelectrochemistry*, 2006, 68, p. 48-55.
13. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Khachatryan K.Kh., Mikaelyan M.S., Boyajyan Z.R., Muradian A.M., Karapetian A.T. // Competitive Interaction of Ethidium Bromide and Hoechst 33258 with DNA. *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, 2007, v. 24, N6, Book of Abstracts, Albany, p. 659.
14. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Pirumyan K.V., Torosyan M.A., Manukyan G.A., Karapetian A.T. // The peculiarities of interaction of EtBr and Hoechst 33258 with DNA. Seminar on «Biotechnology and Health»-2 & DAAD, Yerevan (Armenia), April 21-25, 2008, p. 136.
15. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. // Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA. *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, 2008, v. 25, N6, p. 641-646.
16. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Пирумян К.В., Тавадян Л.А. // Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК спектральным и электрохимическим методами. Доклады, НАН РА, 2008, т. 108, N1, с. 75-83.
17. Vardevanyan P.O., Arakelyan A.V., Antonyan A.P., Baghdasaryan L.S., Sarkisyan G.S. // Cooperative effect of EtBr on DNA- cis-DDP complexes. *J. of Biomol. Struct. and Dyn.*, 2009, V. 26, N6, Book of Abstracts, Albany, p. 877-878.
18. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Shahinyan M.A., Antonyan A.P. // The influence of different EMV on melting parameters of DNA-ligand complexes. International Conference & DAAD Alumni Seminar “Biotechnology and Health-3”, Yerevan (Armenia), October 15-17, 2009, p. 4-10.
19. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Shahinyan M.A., Azizyan R.A. // The influence of different EMV on melting parameters of DNA-ligand. International Conference & DAAD Alumni Seminar “Biotechnology and Health-3”, Erevan (Armenia), October 15-17, 2009, p. 109-110.
20. Вардеванян П.О., Антонян А.П. // Изучение комплексов ДНК с лигандами различной природы. *Биолог. журн. Армении*, LXII, 3(62), 2010, с. 50-58.
21. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Pirumyan K.V., Parsadanyan M.A., Sargsyan Sh. A., Shahinyan M.A. // Complex formation of Hoechst 33258 with DNA at various ionic strengths. An International Symposium on Biomolecules: Theory to experiment. May 17-21, 2010, Tsakhkadzor, Armenia. p.52.
22. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Pirumyan K.V., Azizyan R.A. // Different binding modes of EtBr with DNA. An International Symposium on Biomolecules: Theory to experiment. May 17-21, 2010, Tsakhkadzor, Armenia. p.53-54.
23. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Shahinyan M.A. // The influence of hydration of interaction of noncovalently binding ligands with DNA. International Conference & DAAD Alumni Seminar “Biotechnology and Health-4”, Erevan (Armenia), October 28-30, 2010, p. 104.
24. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Шагинян М.А., Карапетян А.Т. // Взаимодействие нековалентно связывающихся лигандов с ДНК. Доклады НАН РА, т. 111, N4, 2011, с. 352-358.
25. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Torosyan M.A., Karapetian A.T. // The Influence of GC/AT Composition on Intercalating and Semi-Intercalating Binding of Ethidium Bromide to DNA. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, Vol. 23, No. 11, p. 2016-2020.

26. Karapetian A.T., Manukyan G.A., Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. // Millimeter electromagnetic waves change the physical characteristics of the water-saline solutions of DNA. International Conference "Current Problems of Chemical Physics" dedicated to the 50th anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA. 9-12 Oct., 2012, Yerevan, Book of Abstracts, p. 215-216.
27. Tavadyan L.A., Minasyan S.H., Manukyan Z.H., Elchinyan S.A., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Hambardzumyan L.A., Vardevanyan P.O. // Interactions of ds-DNA with intercalating drugs by differential pulse-voltammetry and spectroscopy. International Conference "Current Problems of Chemical Physics" dedicated to the 50th anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA. 9-12 Oct., 2012, Yerevan, Book of Abstracts, p. 200-201.
28. Vardevanyan P. O., Arakelyan V. B., Antonyan A.P., Mukhaelyan Zh. H., Hambardzumyan L. A., Karapetian A. T. // Novel interpretation of the isotherms of multimodal ligands binding with DNA. J. of Biomol. Struct. And Dyn., Volume 31, Supplement 1, 2013. Special Issue: Book of Abstracts. Albany, 2013: The 18th Conversation, p. 58.
29. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Амбарцумян Л.А. // Механизмы связывания метиленового синего с ДНК. Журнал прикладной спектроскопии, 2013, т. 80, N 4, с. 610-614.
30. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Shahinyan M.A., Karapetian A.T. // Thermodynamic analysis of DNA complexes with Methylene Blue, Ethidium Bromide and Hoechst 33258. Biopolymers and Cell, 2013, v. 29, N 6, p. 515-520.
31. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Шагинян М.А., Амбарцумян Л.А. // Исследование связывания метиленового синего с ДНК спектроскопическими методами. Доклады, НАН РА, 2013, т. 113, N 2, с. 180-188.
32. Novhannisyanyan G.G., Arakelyan V.B., Antonyan A.P., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O. // Analysis of isotherms with two binding sites in the region of small fillings. Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013, p. 75-79.
33. Антонян А.П. // Кислотная денатурация комплексов бромистого этидия с ДНК. Биол. журнал Армении, 2 (65), 2013, с. 31-36.
34. Vardevanyan P.O., Minasyants M.V., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P. // Multimodal interaction of Hoechst 33258 minor groove binder and Ethidium Bromide intercalator with DNA. Biolog. Journal of Armenia, 2014, 1 (66), p 59-65.
35. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Novhannisyanyan G.G., Shahinyan M.A. // Analysis of experimental binding curves of EtBr with single- and double-stranded DNA at small fillings. Modern Physics Letters B, 2014, V. 28, N 22, 1450178-1 – 1450178-11.
36. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Минасянц М.В. // Спектры поглощения и флуоресценции комплексов полинуклеотидов с бромистым этидием. Известия НАН Армении, Физика, 2015, т. 50, N 4, с. 511-519.
37. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Shahinyan M., Melqonyan G. // Behavior of Ethidium bromide-Hoechst 33258-DNA and Ethidium bromide-Methylene blue-DNA triple systems by means UV melting. International Journal of Spectroscopy, 2015, v. 2015, p. 1-5.

38. Antonyan A.P. // Binding mechanisms of methylene blue and Hoechst 33258 with DNA. Proceedings of The Yerevan State University, Chem. and Biol., 2015, N3, p. 29-34.
39. Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Vardevanyan P.O. // Analysis of fluorescence spectra of complexes of Methylene Blue with DNA. Biolog. Journal of Armenia, 2015, 1 (67), p 35-39.
40. Antonyan A.P., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O. // Study of poly(dA) structure in the acidic media. Biolog. Journal of Armenia, 2015, 2 (67), p 29-35.
41. Antonyan A.P. // Different modes of binding of Hoechst 33258 with DNA. Biolog. Journal of Armenia, 2015, 3 (67), p 6-10.
42. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Torosyan M., Karapetian A. // Joint interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters. J. of Biomol. Struct. and Dyn., 2016, V 34, N 7, p. 1377-1382.
43. Мамасакхлисов Е. Ш., Антопян А.П., Мамасакхлисов А.Е., Тоноян А, Вардеванян П.О. // Флуктуации при переходе порядок-беспорядок в комплексах ДНК-лиганд, использующих различные механизмы связывания. Известия НАН РА Физика, т. 52, N2, 2017, с. 235-243.

ԱՆՏՈՆՅԱՆ ԱՐԱ ՊԵՏԻԿԻ

ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ԻՆՏԵՐԿԱԼՅԱՏՈՐ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

ԱՄՓՈՓՈԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. Տեսական մոդել, բազմաբնույթ լիզանդ, երկշղթա ԴՆԹ, միաշղթա ԴՆԹ, ինտերկալացիա, կիսահինտերկալացիա, ակոսային կապում:

Աշխատանքում զարգացվել է ԴՆԹ-ի հետ որոշ լիզանդների (էթիդիումի բրոմիդ (ԷԲ), ակտինոմիցին Դ (ԱՄԴ)) կոմպլեքսների կոոպերատիվ փոխարկումների տեսություն, որում հաշվի է առնվում ԴՆԹ-ի տարբեր ձևերի հետ լիզանդների կապման կամայական թվով եղանակների հնարավորությունը:

Ստացված են արտահայտություններ, որոնք նկարագրում են ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների հալման բնույթագրերի փոփոխության բազմահարաչափային կախվածությունը լիզանդի կոնցենտրացիայից և թույլ են տալիս որոշելու այդ կոմպլեքսների թերմոդինամիկ մեծությունները, ինչպես նաև կոմպլեքսների բնափոխման աստիճանը և համահարաբերակցական երկարությունը:

Զարգացված տեսությունը թույլ է տալիս նաև բացահայտելու կապման այնպիսի եղանակներ, որոնք քողարկված են այլ եղանակներով, ինչպես նաև բազմաթիվ լիզանդներից հայտնաբերել և առանձնացնել այնպիսիք, որոնք հանդիսանում են բազմաբնույթ:

Զարգացված տեսությունը նաև ի հայտ է բերում միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության բազմաթիվ եղանակներ և հնարավորություն է ընձեռում տեսականորեն հաշվարկելու կապման այդ եղանակներին համապատասխանող թերմոդինամիկ պարամետրերը: Բացի այդ, առաջարկված տեսության կարևոր դրույթներից մեկն այն է, որ մեկ տիպի լիզանդի բազմաթիվ եղանակներով փոխազդեցությունը չի հանդիսանում տարբեր լիզանդների մեկ, իրարից տարբեր եղանակներով փոխազդեցության հանրագումար:

ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների բազմաբնույթ փոխազդեցության փորձարարական տվյալների վերլուծությունը լիզանդների բազմաբնույթ կապման տեսության միջոցով թույլ է տալիս բացահայտելու այն գործոնները, որոնց պայմաններում տվյալ լիզանդը դրսևորում է կամ չի դրսևորում կապման բազմաբնույթ հատկություններ:

Մասնավորապես, ստացված տվյալները ի հայտ են բերել, որ ԷԲ-ը ոչ միայն դասական ինտերկալատոր է, այլև այն կարող է համարվել բազմաբնույթ լիզանդի դասական ներկայացուցիչ: Այդ մասին է վկայում այն, որ լուծույթի իոնական ուժը կամ pH-ը չեն ազդում ԴՆԹ-ի հետ այդ լիզանդի կապման եղանակների դրսևորման վրա: Ավելին, ԷԲ-ի բազմաբնույթ փոխազդեցությունը դրսևորվում է նաև այլ լիզանդների առկայության պայմաններում:

ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալատոր լիզանդ մեթիլեն կապույտի (ՄԿ)

կումպլեքսների համար ստացված փորձարարական տվյալների համանման վերլուծությունը վկայում է, որ այդ լիզանդի բազմաբնույթ փոխազդեցության հատկությունը կախված է լուծույթի իոնական ուժից:

Փոքր իոնական ուժերի պայմաններում այն իրեն դրսևորում է որպես բազմաբնույթ լիզանդ, հարաբերականորեն մեծ իոնական ուժերում՝ այն չի հանդիսանում այդպիսին, քանի որ այս դեպքում լրիվ ինտերկալյացիա չի հայտնաբերվում:

Ուսումնասիրվել է նաև ԴՆԹ-ի հետ ոչ ինտերկալյատոր, դրա փոքր ակոսում հատկորոշիչ կապվող H33258-ի փոխազդեցությունը: Փորձարարական տվյալները ի հայտ են բերում, որ այս լիզանդը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է երկու եղանակներով, որոնցից մեկը ուժեղ, մյուսը թույլ:

Բացահայտվել է նաև, որ ԴՆԹ-ի հետ H33258-ի կապման մեխանիզմների դրսևորումը կախված է լուծույթի իոնական ուժից, քանի որ փոքր իոնական ուժերի դեպքում այն հիմնականում կապվում է ինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով, իսկ հարաբերականորեն մեծ իոնական ուժերի դեպքում այս լիզանդի կապման մեխանիզմը որակապես փոխվում է. ինտերկալյացոն եղանակ չի դրսևորվում և H33258-ը սկսում է տեղակայվել ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում, հատկորոշիչ կապվելով ադենին-թիմին զույգերի հետ:

Փորձարարականորեն հայտնաբերված է, որ որոշակի իոնական ուժերում ($0,002 < \mu < 0,004$ մոլ) միաժամանակ կարող են դրսևորվել ԴՆԹ-ի հետ H33258 միացության կապման այդ երկու ուժեղ եղանակները, որոնցից մեկը համապատասխանում է «Գանալի-կողպեք» սկզբունքին (ակոսային կապում), մյուսը՝ այսպես կոչված «fit-to-fit», որի դեպքում լիզանդի մոլեկուլը և ԴՆԹ-ի կապման համապատասխան տեղամասը տարածականորեն փոխհապատասխանություն են ձեռք բերում (ինտերկալյացիա): Այդ երկու, իրար հակադարձ մեխանիզմների միաժամանակյա դրսևորումը բնութագրում է H33258 միացությանը որպես բազմաբնույթ լիզանդ, չնայած այն, որպես այդպիսին, չի համապատասխանում բազմաբնույթ լիզանդների համար զարգացված տեսության պահանջներին:

INTERACTION OF INTERCALATOR LIGANDS WITH DNA

SUMMARY

Keywords: Theoretical model, multimodal ligand, double-stranded DNA, single-stranded DNA, intercalation, semi-intercalation, groove binding.

This work has been prepared to develop a theory of cooperative transitions of complexes of some ligands (ethidium bromide (EtBr), actinomycin D (AMD)) with DNA, in which the possibility of arbitrary number of the binding modes of ligands to various forms of DNA has been considered (theory of multimodal binding of ligands with DNA – MBL theory).

The expressions obtained describe the multiparametric dependence on ligand concentration as melting parameters of the DNA-ligand complexes change, and enable to determine the thermodynamic values of these complexes as well as the degree of denaturation of complexes and the length of correlation.

The developed theory also allows to identify such modes of binding which are hidden by other modes as well as to reveal and separate multimodal ligands among others.

The MBL theory also permits revealing the interaction of multimodal ligands with single-stranded DNA by more than one modes and theoretically calculating the thermodynamic parameters that correspond to these binding modes. One of the important conclusions of the developed theoretical model is that the binding of one type ligand to DNA by several modes simultaneously does not result in the binding of different ligands by one mode differing from others.

The analysis of experimental data of multimodal interaction of ligands with DNA through the MBL theory allows identifying the factors in the presence of which the given ligand either shows or does not show multimodal properties of the binding.

Particularly, the obtained data showed that EtBr is not only a classical intercalator, but can also be considered a classical representative of the multimodal ligand. This can be supported by the fact that ionic strength or pH of the solution do not affect the appearing of the binding modes of this ligand to DNA. Moreover, EtBr multimodal interaction takes place in the presence of other ligands, as well.

The analogous analysis of experimental data obtained for intercalator-ligand methylene blue (MB) complexes with DNA indicates that multimodal interaction property of this ligand depends on the solution ionic strength.

In low ionic strengths conditions, it behaves like a multimodal ligand; in relatively high ionic strengths conditions, however, it does not behave like that since in this case a complete intercalation is not observable.

The interaction of non-intercalator, specifically in minor groove binding ligand – H33258 with DNA was also studied. Experimental data showed that this ligand binds with DNA by two modes – strong and weak.

What was also revealed was that appearing of the binding mechanisms of this ligand with DNA depends on the solution ionic strength since at low ionic strengths of the solution

H33258 mainly binds with DNA by intercalation and electrostatic modes, while in the case of relatively high ionic strengths the binding mechanism radically changes as no intercalation mode appears while H33258 binds in the DNA minor groove, specifically binding to adenine-thymine pairs.

Experimentally, it was also shown that at certain ionic strengths ($0.002 < \mu \leq 0.004$ M) these two strong binding modes may appear simultaneously, one of which corresponds to a “key-to-lock” principle (minor groove binding mode), the other to the so called “fit-to-fit” principle when the ligand molecule and the respective site on DNA acquire dimensionally mutual fitness (intercalation mode of binding). The simultaneous occurrence of these two contrary mechanisms characterizes H33258 as a multimodal ligand, although, as a multimodal ligand, it does not meet the requirements of the MBL theory.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'U. W. B.', located in the lower right quadrant of the page.