

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АНТОНЯН АРА ПЕТИКОВИЧ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИГАНДОВ ИНТЕРКАЛЯТОРОВ С ДНК

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора
биологических наук

по специальности 03.00.02 – Биофизика и биоинформатика

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор П.О. Вардеванян

Е Р Е В А Н 2017 □

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1.	
1.1. Общие сведения о нековалентном связывании лигандов с ДНК.....	11
1.2. Желобковое связывание лигандов с ДНК	15
1.3. Электростатическое взаимодействие	18
1.4. Интеркаляционное связывание лигандов с ДНК.....	19
1.4.1. Моноинтеркаляторы.....	27
1.4.2. Бис-интеркаляторы.....	30
1.4.3. Полиинтеркаляторы.....	30
1.5. ДНК-биосенсоры и ДНК биочипы.....	40
ГЛАВА 2. Теория перехода спираль-клубок комплексов	
ДНК с мультимодальными лигандами.....	47
2.1. Теоретическое исследование плавления комплексов	
ДНК с мультимодальными интеркаляторами.....	47
2.1.1. Параметры теории	52
2.1.2. Сравнение теории с экспериментом.....	57
2.2. Флуктуации при переходе порядок-беспорядок в комплексах	
ДНК-лиганд, использующих различные механизмы связывания	61
ГЛАВА 3. Энергетика кооперативных переходов	
комплексов ДНК с лигандами.....	69
3.1. Энергетика взаимодействия ДНК с интеркаляторами	
бромистым этидием и метиленовым синим.....	69
3.1.1. Денатурация комплексов БЭ-ДНК:	
Влияние ионной силы и рН раствора.....	72

3.2.	Взаимодействие ДНК с неинтеркалятором Hoechst 33258.....	85
3.2.1.	Плавление комплексов ДНК с Hoechst 33258:	
	Влияние ионной силы раствора.....	86
3.3.	Взаимодействие ДНК с неклассическим	
	интеркалятором метиленовым синим.....	94
3.3.1.	Плавление комплексов ДНК с МС.....	96
3.4.	Исследование одновременного связывания двух типов	
	лигандов с ДНК.	104
3.4.1.	Совместное связывание классического интеркалятора БЭ и	
	классического желобково связывающегося соединения	
	Hoechst 33258 с ДНК.....	105
3.4.2.	Совместное взаимодействие интеркаляторов бромистого этидия	
	и метиленового синего с ДНК	113
ГЛАВА 4. Термодинамика взаимодействия ДНК с лигандами.....		120
4.1.	Модели связывания лигандов с ДНК.....	121
4.1.1.	Решеточная модель адсорбции.....	122
4.1.2.	Модели связывания лигандов с макромолекулами.....	127
4.1.3.	Взаимодействие между связанными лигандами.....	133
4.2.	Экспериментальная оценка термодинамических параметров	
	связывания бромистого этидия с ДНК.....	134
4.2.1.	Исследования комплексов БЭ с ДНК методом дифференциальной	
	импульсной вольтамперометрии	137
4.2.2.	Определение параметров связывания БЭ с дц-ДНК на основании	
	исследований спектроскопическими и электрохимическими	
	методами	141
4.3.	Взаимодействие интеркалятора метиленового синего с ДНК.....	159
4.4.	Взаимодействие неинтеркалятора Hoechst 33258 с ДНК.....	168

ГЛАВА 5. Материалы и методы.....	178
5.1. Используемые препараты и приборы.....	178
5.2. Переход спираль-клубок ДНК и ее комплексов с лигандами методом УФ денатурации.....	179
5.3. Приготовление комплексов ДНК с исследованными лигандами.....	180
5.4. Методы абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии в изучении взаимодействия лигандов с ДНК	181
5.5. Определение связанных молекул лигандов из спектров поглощения и флуоресценции	182
5.6. Методы дифференциальной импульсной и квадратно-волновой вольтамперометрии.....	183
5.7. Построение графиков Скетчарда.....	185
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	187
ВЫВОДЫ.....	189
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	192

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 [1-3]. 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 [4].

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 [4,5]. Тем не менее, конденсированное состояние ДНК не препятствует ее активному участию в различных биологических процессах, поскольку она может обратимо 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 [1-5]

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, связывающимися 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 связывании с молекулой ДНК в клетке, для чего необходима достоверная информация о взаимодействии лигандов с ДНК [5,6].

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 [1-6].

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 Н33258 с ДНК;
- Результаты экспериментальных исследований по одновременному взаимодействию БЭ и Н33258, БЭ и МС с ДНК;
- Результаты экспериментальных исследований по определению влияния ионной силы раствора на особенности связывания БЭ, МС и Н33258 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, полуинтеркаляционным и электростатическим способами. Впервые показано, что способы связывания БЭ с ДНК универсальны и не зависят от условий среды (ионной силы, рН 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. Н33258, 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.

ГЛАВА 1

1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О НЕКОВАЛЕНТНОМ СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ С ДНК

Взаимодействие различных низкомолекулярных веществ с нуклеиновыми кислотами - НК (ДНК и РНК) является объектом интенсивного исследования уже более пятидесяти лет. Интерес к этим исследованиям связан с тем, что НК в клетке окружены множеством различных соединений, в том числе – макромолекулами (белками и другими молекулами НК), низкомолекулярными соединениями органической и неорганической природы, различными ионами металлов и др. [1].

Известно, что живые организмы содержат уникальную программу самостоятельного воспроизводства, которая закодирована в молекуле ДНК, что дает право назвать ее важнейшей молекулой жизни [2]. При этом, находясь в окружении различных веществ, она реализует свои структурные и функциональные свойства посредством образования комплексов с ними. С ДНК непосредственно могут связываться также проникшие извне натуральные или синтетические вещества, благодаря ее уникальной структуре, которая является линейной молекулой, состоящей из двух завитых друг на друга нитей (двухцепочечная структура) [3].

При этом, между двумя цепочками ДНК действуют связи двух типов – горизонтальная и перпендикулярная. Горизонтальные связи образуются между азотистыми основаниями нуклеотидов, входящих в состав каждой полимерной цепочки ДНК. Эти связи реализуются атомами водорода (водородные связи) - между адениновыми (А) и тиминовыми (Т) основаниями образуются две, гуаниновыми (Г) и цитозиновыми (Ц) основаниями – три связи. Перпендикулярные взаимодействия образуются между плоскостями пар азотистых оснований ДНК (стекинг взаимодействия) (рис. 1) [3].

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК

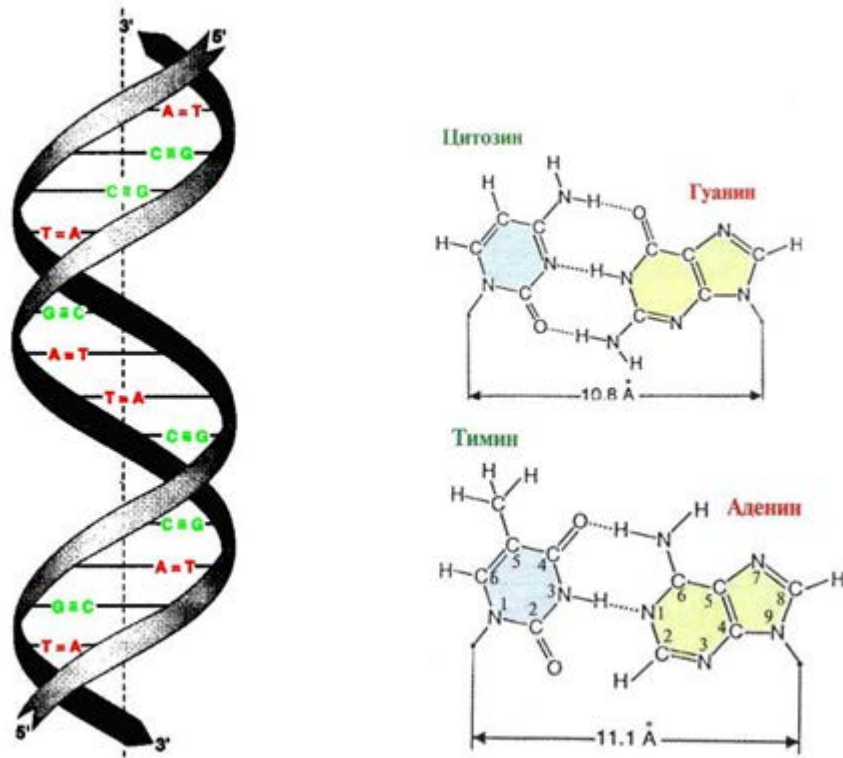


Рис. 1. Двухцепочечная структура ДНК [7].

За счет линейного расположения нуклеотидов вдоль полимерной цепи ДНК и формируется генетический код. Необходимо отметить, что этот код, с одной стороны, является постоянным, вследствие двухцепочечного строения ДНК, с другой стороны, он изменчив, поскольку всегда подвергается влиянию различных физических или химических факторов [4]. В образовании структуры ДНК существенную роль играют различные (вышеуказанные) соединения, которые можно называть биологически активными веществами (БАВ) [5].

Некоторые из них в клетке могут содержаться или проникать извне в малых количествах, однако, связываясь с ДНК, они нарушают процессы репликации, транскрипции и др., т.е. нарушают передачу генетической информации. В большинстве случаев БАВ являются токсическими, а также могут вызывать мутации или приводить к опухолеобразованию [5]. Несмотря на это, такие вещества могут служить основой для синтеза лекарственных препаратов противомикробного, противовирусного или противоопухолевого действия.

Одной из особенностей БАВ является их специфичность к определенным участкам ДНК, что повышает интерес к ним и в настоящее время лежит в основе стратегии создания новых подходов для анализа аномалий в структуре ДНК и создания относительно безвредных лекарственных веществ [1,4,6].

После выяснения структуры и функций ДНК стало очевидным, что центральная догма молекулярной биологии в простейшем виде описывает передачу информации из последовательности ДНК к РНК, из РНК к протеину по следующей схеме:

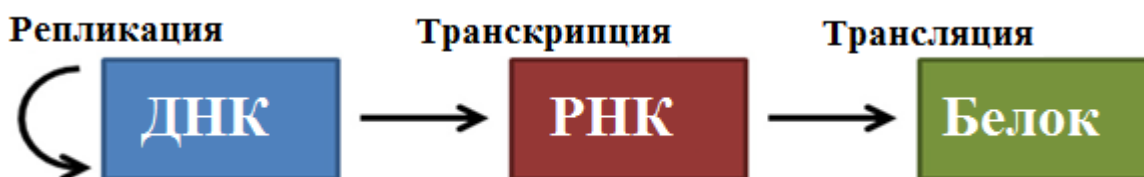


Схема 1. Центральная догма молекулярной биологии [8].

Таким образом, в виде двойной спирали, ДНК сохраняет генетический материал для всех живых организмов, в процессе транскрипции генетическую информацию передает к РНК, которая вследствие трансляции превращается в протеины. С помощью этих реакций ДНК диктует и с высокой точностью контролирует практически все клеточные процессы [2,9].

Каждая клетка в основном имеет всего одну копию из каждой молекулы ДНК в геноме (в виде гомологичных хромосом), поэтому контроль генной экспрессии с помощью малых молекул (лигандов), специфичных к определенным последовательностям, может иметь важное значение при лечении различных заболеваний. Если определена генетическая мишень (специфическая последовательность ДНК), то, с помощью конкретного лиганда (и идентичных ему лекарств), можно лечить многие болезни.

Этот подход можно противопоставить протеиновой терапии, поскольку в этом случае необходимо синтезировать и идентифицировать большое число лекарственных веществ, которые ингибируют определенные протеины, учитывая также то, что многие из них в клетке существуют во множественных копиях [10].

Теоретически ДНК является мишенью для многих лигандов, однако до сих пор не получены такие соединения, которые обладают специфичностью к определенным последовательностям ДНК и одновременно используются клинически, в целях ингибирования транскрипции [11].

ДНК является конформационно гибкой макромолекулой и обладает структурной изменчивостью, что позволяет ей приспосабливаться к связыванию других соединений (лигандов, протеинов) в ее большом или малом желобке, при встраивании в плоскость между парами оснований, при связывании с внешней стороны, или при реализации этих способов одновременно [8].

Низкомолекулярные вещества с ДНК могут связываться ковалентно, например, *cis*-DDP (цис-диаминдихлороплатина(II)) и нековалентно, с различными механизмами [12-17].

Нековалентное связывание лигандов может происходить за счет непосредственного химического взаимодействия с ДНК, или лиганд может вызывать повреждения в ней опосредованно [18]. Обратимое связывание лигандов с двухцепочечной (дц-) ДНК можно представить несколькими типами:

- электростатическое связывание с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК;
- связывание с большим желобком;
- связывание с малым желобком;
- интеркаляция молекулы лиганда в плоскость между парами оснований в большом желобке ДНК;
- интеркаляция молекулы лиганда в плоскость между парами оснований в малом желобке ДНК;
- ступенчатая интеркаляция (полиинтеркаляция).

В зависимости от структуры как ДНК, так и молекулы лиганда, последние могут связываться с ней более чем одним из этих способов. По основному механизму взаимодействия в настоящее время лиганды подразделяются на два больших класса – интеркаляторы и желобково связывающиеся соединения [18].

1.2. Желобковое связывание лигандов с ДНК

Лиганды этой группы локализуются в одном из желобков (в большинстве случаев, в малом) ДНК и непосредственно взаимодействуют с АТ или ГЦ парами, а также краями желобка (рис. 2). Желобковое связывание не вызывает больших конформационных изменений в структуре ДНК, и этот тип можно отнести к соответствию “ключ к замку”. Большинство из желобково связывающихся лигандов имеет форму “полулуны”, и такая геометрия особенно

подходит к форме малого желобка ДНК [19,20]. Желобково связывающиеся лиганды можно характеризовать следующими особенностями:

- имеют гетероциклические или ароматические углеводородные кольца, которые обладают определенной ротационной свободой, вследствие чего эти соединения приобретают геометрические соответствия к малому или большому желобку ДНК, вытесняя определенное количество связанной воды при локализации в одну из них;
- молекулы лиганда “определяют” мишень, которая содержит специфические последовательности, с которыми лиганд связывается;
- эти мишени содержат примерно от 16 до 18 пар оснований;
- лиганд связывается со спиралью ДНК нековалентно;
- желобково связывающиеся лиганды взаимодействуют с концами пар оснований в малом или большом желобке.

Желобковое связывание обычно стабилизируется гидрофобными силами, поскольку отсутствие структурных изменений в молекуле ДНК не вызывает больших изменений свободной энергии комплекса. Большинство лигандов, связывающихся в малом желобке ДНК, АТ-любивые, поскольку эти пары являются более гидрофобными. При связывании этих лигандов ароматические кольца взаимодействуют со вторым углеродом аденина. На клеточном уровне эти лиганды ингибируют клеточный цикл в G2-M фазе [22]. Желобково связывающиеся лиганды интересны тем, что обладают способностью влиять на экспрессию генов, поражать ДНК или связываться с ней селективно. С этой точки зрения, некоторые соединения, в частности, дистамицин А, СС-1065, Hoechst 33258 (H33258) являются антинеопластическими агентами, имеют антибактериальные, антигрибковые, противовирусные свойства, а также являются флуоресцентными красителями ДНК. Эти вещества могут применяться с другими лигандами для цитотоксичных целей, а также для уменьшения токсичности других лекарств [23-27]. В частности, совместное

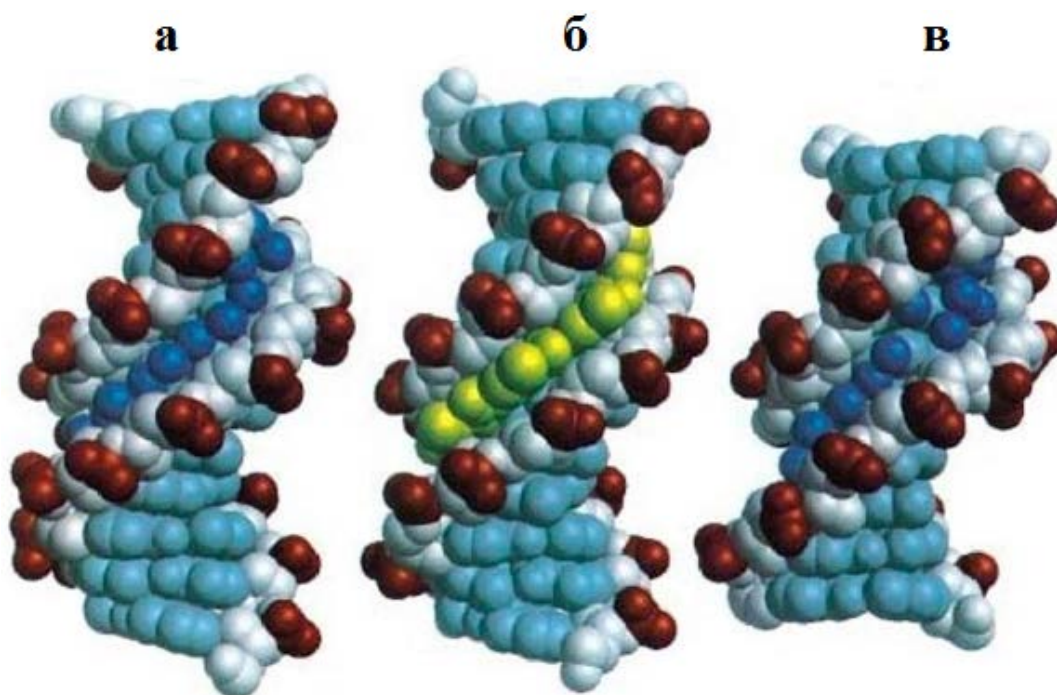


Рис. 2. Структура дц-додекамера d(CGCGAATTCGCG) (Protein Data Base BDL084), как модель В-ДНК, с молекулами воды в малом желобке (синие шарики) (а), с желобково связывающим лигандом дистамицином А (Protein Database GDL003) (б) и дц-декамера d(CCAGGCCTGG) (Protein Database BDJS30) с молекулами воды в малом желобке (синие шарики) (в) [21].

применение дистамицина А с дукармицином А уменьшает токсичность последнего в 10 раз [28]. Селективное узнавание малого или большого желобка молекулами лиганда во многом обуславливается гидратной оболочкой этих бороздок. Особая упорядоченность гидратной оболочки присуща малому желобку ДНК, в котором молекулы воды соединены цепочкой, в которой эти молекулы имеют долговременную “оседлую жизнь” [5,28].

Эта цепочка образует водный “хребет” малого желобка и сшивает его края, что и обуславливает геометрические особенности этой бороздки [5,28]. Связывание лигандов в малом желобке вызывает разрушение упорядоченности водного хребта, что и обуславливает энтропийную природу этого процесса. При этом, гидратация молекул лиганда, перемещенных из раствора в связанное состояние, может возрастать примерно на порядок, что, однако, является энтропийно невыгодным [5,28]. Таким образом очевидно, что селективное связывание лигандов в малом желобке ДНК обусловлено водой, которая стабилизирует комплексы за счет образования водных мостиков между молекулами лиганда и стенками малого желобка [5,28-31].

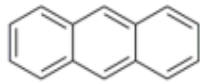
1.3. Электростатическое взаимодействие

Стабильность дц-ДНК в водных растворах во многом обеспечивается за счет нейтрализации электроотрицательного отталкивания между фосфатными группами противоположных цепей. Это достигается с помощью содержащихся в растворе катионов. Исходя из этого становится очевидным, что на нековалентное связывание лигандов с ДНК влияет электростатическое взаимодействие. Так, специфическое связывание катионных органических молекул с ДНК нейтрализует отрицательный заряд фосфатных групп и обуславливает освобождение противоионов от ДНК. Этот процесс приводит к энтропийному вкладу в изменение свободной энергии связывания [18]. Электростатическое взаимодействие между лигандом и ДНК зависит от

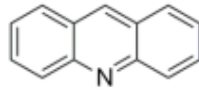
концентрации соли в растворе и обычно ослабевает незначительно при физиологических условиях для монокатионных органических лигандов, связывающихся в малом желобке ДНК, а также в случае интеркаляторов. С другой стороны, электростатическое связывание вносит большой вклад в изменение свободной энергии в случае многозарядных молекул, в том числе белков, при связывании с ДНК. Более того, электростатический вклад $\Delta G_{эл}$ является одним из важнейших при образовании комплексов биомакромолекул с различными лигандами. Он включает внутри- и межмолекулярные кулоновские взаимодействия парциальных атомных зарядов, взаимодействие с индуцированными зарядами гидратной оболочки и взаимодействие с противоионами [32,33].

1.4. Интеркаляционное связывание лигандов с ДНК

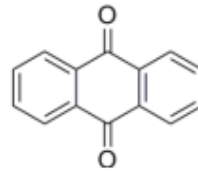
Интеркаляторы представляют класс соединений, содержащих группу ароматических колец, большинство из них носят положительные заряды или непосредственно в ароматических кольцах, или выступающих цепях (рис. 3) [18,34]. Типичными представителями являются акридиновые вещества, в том числе - профлавин (ПФ), акридиновый оранжевый (АО), актиномицин Д (АМД), метиленовый синий (МС) и др. (рис. 3), фенантридиновые соединения, в частности бромистый этидий (БЭ), пропидий иодид (ПИ) и др (рис. 3). Плоская группа ароматических колец вступает в перпендикулярное взаимодействие с плоскостями пар оснований, образуя интеркаляционный комплекс с ними. Интеркаляция происходит без водородных связей, по принципу модели исключенных мест связывания (см. [18]). Когда ДНК насыщена молекулами интеркалятора, каждое второе потенциальное место для интеркаляции становится недоступным. Интеркаляция стабилизируется за счет гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых сил, водородных связей, а также перераспределением заряда [35]. Многие интеркаляторы могут проявить



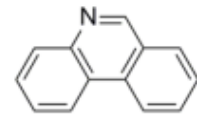
антрацен



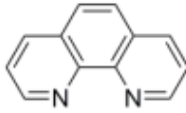
акридин



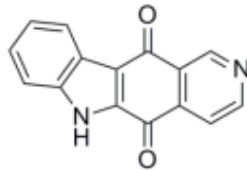
антрахинон



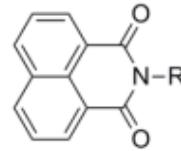
фенантридин



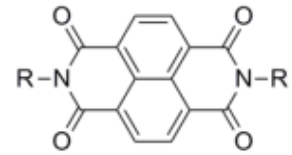
фенантролин



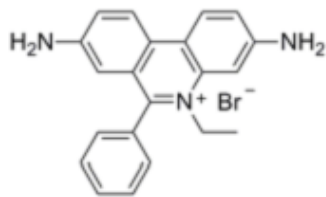
эллиптицин



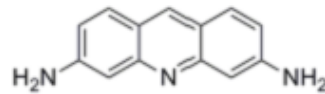
нафталимид



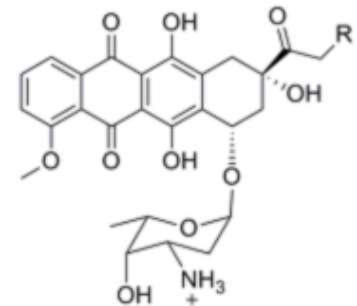
нафтален диимид



бромистый этидий

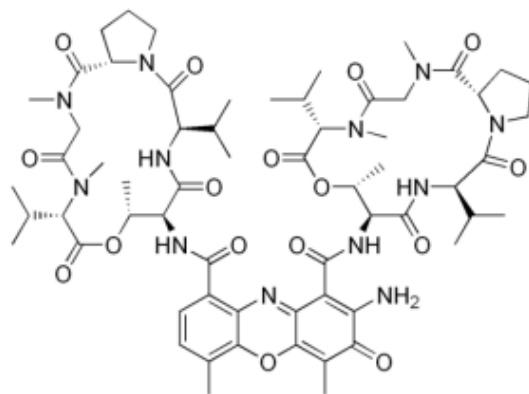


профлавин

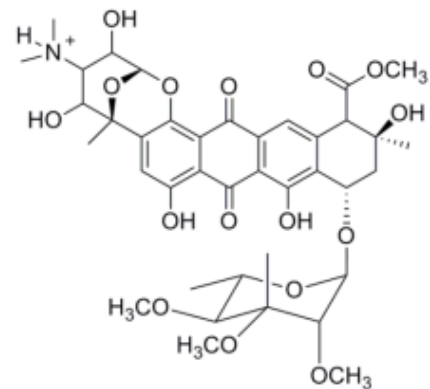


R = H дауномицин

R = OH доксорубицин



актиномицин Д



ногаламицин

Рис. 3. Химическая структура некоторых интеркаляторов [8].

специфичность к АТ или ГЦ последовательностям, что указывает на то, что и другие факторы способствуют интеркаляции.

Интеркаляторы имеют практическое значение, поскольку применяются в качестве химиотерапевтических средств при лечении опухолей [1]. Существует значительное число интеркаляторов, которые можно разделить на классические и не классические. Классическими интеркаляторами являются БЭ, ПФ, которые первыми были описаны и исследованы. Выявлены многие аспекты их интеркаляции в ДНК [1]. Процесс интеркаляции впервые описал Лерман (см [1]), который обнаружил, что добавление этих лигандов вызывает изменения в структуре ДНК – она удлиняется и раскручивается. Дальнейшие исследования выявили, что интеркаляция сопровождается большим изменением энтропии, без изменения энтальпии.

Интеркаляторы подразделяются на различные подклассы: антрацены, акридины, антрахиноны, фенантридины, фенантролины, эллиптицины, нафталены (НФ) и нафтален диимиды (НФД) (рис. 3) [36]. Многие интеркаляторы, например антрациклины (дауномицин, адриаамицин и др.) ингибируют синтез ДНК и РНК. Эти интеркаляторы являются наиболее распространенными химиотерапевтическими агентами при лечении некоторых форм опухолей, в частности при лейкемии [1]. Однако многие из них не предназначены для применения в терапевтических целях, поскольку имеют разрушающий побочный эффект из-за недостатка специфичности к определенным участкам ДНК [37].

Ступенчатые интеркаляторы имеют субъединицы, которые одновременно связываются в малом и большом желобках ДНК, и эти интеркаляторы, имеющие мульти-интеркалирующие единицы, называются полиинтеркаляторами, характеризуются высокой специфичностью и сродством к определенным последовательностям ДНК [8].

Узнавание геометрии ДНК-интеркалятор комплексов имеет важное значение для выяснения термодинамических особенностей механизмов

связывания и для определения движущих сил комплексообразования. При этом, количественное определение термодинамических характеристик образовавшихся комплексов может стать основой для конструирования новых препаратов и повышения их селективности к определенным участкам ДНК.

Процесс интеркаляции начинается с переноса молекулы лиганда из водного окружения в плоскость между парами оснований ДНК. Интеркаляционный сайт гидрофобный по отношению к водному окружению свободного лиганда. Этот процесс можно представить как благоприятный гидрофобный перенос, поскольку вывод неполярной молекулы лиганда из воды приводит к разрушению упорядоченной гидратной оболочки лиганда, что является энтропийно выгодным [1,38-40]. При интеркаляции лиганда в ДНК происходят определенные конформационные изменения для образования интеркаляционного участка: пары оснований вдоль длины ДНК расходятся примерно на $3,4\text{\AA}$ для вставки молекулы лиганда в плоскость между ними. Это, в свою очередь, приводит к раскручиванию сахара-фосфатного остова относительно главной оси спирали, за счет чего образуется интеркаляционная полость [36-38]. При этом происходит локальное раскручивание последующих друг за другом пар оснований по соседству с интеркаляционным участком, за счет чего увеличивается расстояние между фосфатными группами сахара-фосфатного остова каждой цепи. Эти изменения приводят также к уменьшению локальной плотности заряда и облегчают высвобождение конденсированных на ДНК ионов Na^+ . Вследствие этого происходит перенос молекул лиганда из водной среды в интеркаляционную полость в случае неполярных интеркаляторов [38-40]. В случае катионных интеркаляторов (уже адсорбированных на ДНК), увеличивается концентрация противоионов в участке связывания, т. е. для интеркаляции этих лигандов определенную роль играет также эффект полиэлектролита [1,38-40]. Как только лиганд вклинивается в плоскость между парами оснований, энергия системы оптимизируется с помощью нековалентных связей до стабилизации

образовавшихся комплексов. Движущими силами этих нековалентных взаимодействий являются гидрофобные, ван-дер-Ваальсовы силы, эффект полиэлектролита, стеклинг взаимодействия, а также водородные связи в случае некоторых интеркаляторов [1,38-40].

Изменение свободной энергии при интеркаляции лигандов в ДНК из себя представляет сумму следующих составляющих:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{конф}} + \Delta G_{\text{Т+р}} + \Delta G_{\text{гид}} + \Delta G_{\text{пэ}} + \Delta G_{\text{мол}} \quad (1.1)$$

где ΔG - экспериментальное значение свободной энергии при образовании ДНК-интеркалятор комплексов и определяется с помощью равновесной константы связывания ($K_{\text{инт}}$) по уравнению:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1.2)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура. $\Delta G_{\text{конф}}$ соответствует изменению свободной энергии конформационных изменений, имеющих место вследствие интеркаляции, $\Delta G_{\text{Т+р}}$ соответствует изменению свободной энергии, имеющей место вследствие уменьшения трансляционной и ротационной свободы, $\Delta G_{\text{гид}}$ - изменение свободной энергии при гидрофобных взаимодействиях (этот фактор является основным), $\Delta G_{\text{пэ}}$ – вклад эффекта полиэлектролита, $\Delta G_{\text{мол}}$ – вклад изменения свободной энергии нековалентных молекулярных взаимодействий между лигандом и ДНК [1,38-40]. К тому же, изменение свободной энергии при связывании лигандов с ДНК зависит от вклада обоих – энтропийных и энтальпийных составляющих:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.3).$$

Основной преградой при связывании интеркаляторов с ДНК является отрицательная энтропия, которая вызывает невыгодное изменение $\Delta G_{\text{конф}}$. С другой стороны, $\Delta G_{\text{гид}}$, $\Delta G_{\text{пэ}}$ и $\Delta G_{\text{мол}}$ имеют благоприятный вклад в изменении свободной энергии, что компенсирует нежелательный вклад $\Delta G_{\text{конф}}$. При этом наибольший вклад имеют $\Delta G_{\text{гид}}$ и десольватация, поскольку гидрофобный лиганд экранируется от воды при встраивании в плоскость между парами

оснований. Вклад эффекта полиэлектролита намного меньше в ΔG , однако, опять же предпочтительнее, благодаря энтропийной природе. Когда интеркалятор связывается, отрицательно заряженные фосфатные группы расходятся вследствие раскручивания и удлинения спирали. Помимо этого, противоионы, связанные с фосфатами ДНК, освобождаются и переходят в раствор, поскольку вышеуказанные изменения спирали приводят к уменьшению плотности заряда и эффекта экранирования этими противоионами. Более того, многие интеркаляторы положительно заряжены, что также способствует дальнейшему уменьшению конденсации катионов вдоль сахаро-фосфатного остова ДНК [1,38].

$\Delta G_{\text{мол}}$ имеет энтальпийный вклад, что включает все предпочтительные молекулярные взаимодействия между ДНК и интеркалятором – водородные связи, ван-дер-Ваальсовы, электростатические взаимодействия [41]. Способность интеркалятора распределяться между центрами связывания наиболее часто принимается как специфическое связывание, поскольку другие составляющие свободной энергии считаются неспецифическими.

Термодинамические параметры связывания должны определяться для каждого интеркалятора, так как взаимоотношения вкладов энтальпии и энтропии не всегда ясны, и даже в том случае, когда лиганды схожи структурно и имеют близкие значения K , эти взаимоотношения будут иметь различные значения. В случае некоторых интеркаляторов предпочтительнее вклад энтальпии в связывание, в случае других – энтропии. В частности, доксорубицин и даунорубицин (дауномицин) (рис. 3) являются изоструктурными, но не изоэнергетическими, поскольку в случае доксорубицина и энтальпия, и энтропия имеют предпочтительный вклад, в то время как в случае дауномицина обнаруживается нежелательный энтропийный вклад (рис. 4) [42].

Для понимания деталей интеркаляционного механизма удобным является кинетика связывания, однако, если равновесную константу диссоциации или

ассоциации можно экспериментально измерить, то точные детали многостадийного процесса интеркаляции/деинтеркаляции все еще остаются неясными. Тем не менее, недавние исследования молекулярно-динамическим методом (МДМ) проливают свет на пока что не вполне ясное понимание динамики связывания некоторых простых интеркаляторов. В частности, с помощью моноинтеркалятора профлавина (ПФ) исследована интеркаляция (а также деинтеркаляция) через большой или малый желобок с использованием метадинамической симуляции (МС) [43]. Был обнаружен быстрый переход ПФ из раствора в прединтеркаляционный участок связывания. Затем следуют небольшие изменения для интеркаляции через большой желобок. Деинтеркаляция также имеет место через большой желобок, однако этот процесс замедлен из-за большого энергетического барьера, необходимого для перегруппировки назад в связанное состояние в желобке.

Было проведено также исследование по связыванию дауномицина с ДНК с помощью метадинамического моделирования и USM (umbrella sampling method) [44]. Опять же, дауномицин быстро накапливается в малом желобке. Гораздо медленнее перемещение с метастабильным промежуточным состоянием обнаружено, когда дауномицин вклинивается в плоскость между парами оснований в малом желобке и искривляет спираль ДНК вдали от интеркаляционного участка, как это выявлено в случае природных протеинов, связывающихся в малом желобке. Небольшой энергетический барьер позволяет полному интеркалированию через малый желобок. Аналогичное исследование методами молекулярного моделирования (ММ) и силовыми полями (СП) AMBER проведены для анализа связывания доксорубицина [45]. Как и в предыдущих случаях, интеркалятор быстрее связывается в малом желобке с последующей небольшой перегруппировкой в состояние, когда интеркалятор удаляет друг от друга основания посредством интеркаляции через малый желобок. Во всех этих исследованиях рассчитанное значение изменения

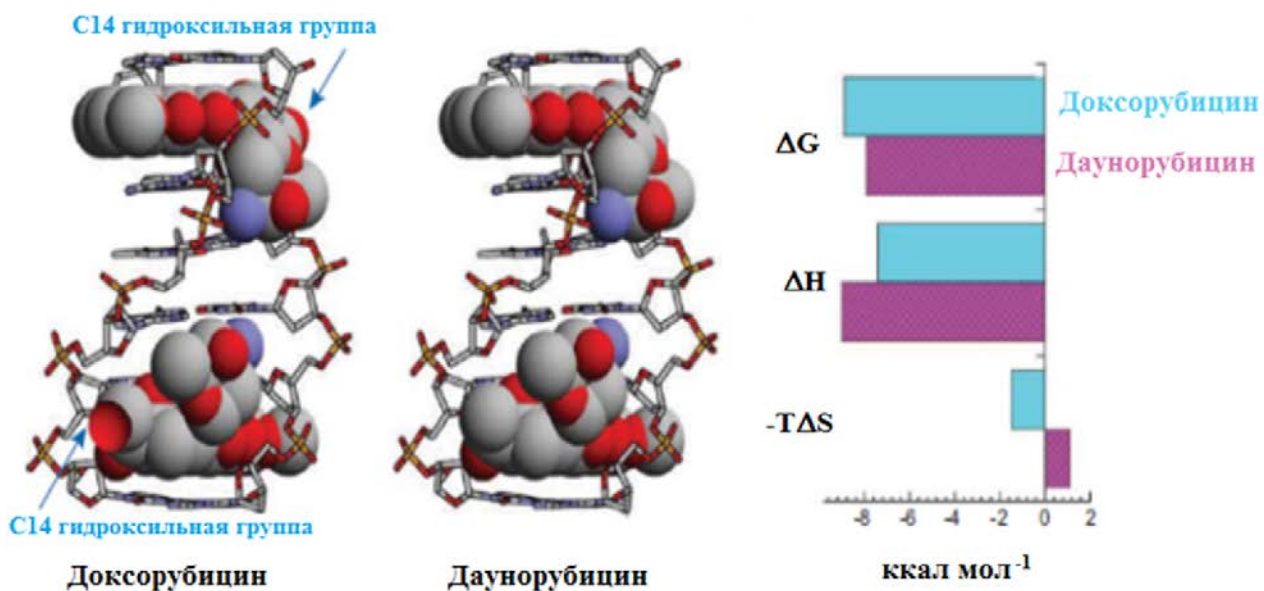


Рис. 4. Интеркаляция доксорубина и даунорубина (дауномицин) в ДНК. Общая свободная энергия (ΔG) показана графически для обоих интеркаляторов вместе с изменениями энтальпии и энтропии. Несмотря на то, что эти интеркаляторы схожи структурно, взаимоотношение вкладов энтальпии и энтропии при их связывании качественно различны [42].

свободной энергии было в соответствии с экспериментально измеренными величинами (порядка 11.7 – 14.8 ккал/моль) [8]. На основании этих данных можно заключить, что интеркаляция через малый или большой желобок зависит от типа интеркалятора. Однако, на примере моноинтеркалятора YOPO и бисинтеркалятора YOYO недавно было показано, что их интеркаляции предшествует связывание без интеркалирования. Было заключено, что “не интеркалирование” не означает “не связывание”. Более того, и связывание, и интеркаляция вместе в целом противоположные процессы и имеют различные временные шкалы [46].

Эти исследования находятся в качественном соответствии с МДМ изучениями. Другое заключение состоит в том, что интеркаляторы вызывают изменения в структуре ДНК для вклинивания в плоскость между парами оснований, в противоположность той общепринятой гипотезе, согласно которой ДНК меняет свою структуру таким образом, чтобы молекула лиганда смогла интеркалировать в ДНК (см. [41]). Деинтеркаляция же является замедленным процессом, поскольку энергетический барьер не позволяет молекуле лиганда вернуться в желобково-связанное состояние после полной диссоциации [8].

1.4.1. Моноинтеркаляторы

Многие моноинтеркаляторы, и в их числе природные соединения актиномицин Д и ногаламицин хорошо исследованы. Последние два являются ступенчатыми моноинтеркаляторами, имеют антибиотическую активность, поскольку ингибируют транскрипцию [47-49]. Эти моноинтеркаляторы являются производными нафталимида или нафталендиимида. Однако нафталимиды, которые впервые были получены в лаборатории Браña, не являются типичными ступенчатыми интеркаляторами и могут взаимодействовать как желобково связывающиеся лиганды за счет основного линкера, часто амина.

Ряд нафталимидов с различными линкерными группами и сердцевиной имеют цитотоксичную активность против опухолей некоторых клеток [50,51]. Обычно сердцевина нафталимидов маленькая и содержит амино или нитро группы, однако некоторые производные нафталимидов имеют длинные гидроксил-алкиламиновые линкеры, которые протягиваются от сердцевины, при этом, алкиламиновые линкеры, которые связаны с имидной группой, взаимодействуют с ДНК по типу ступенчатого связывания [52].

Два производных нафталимидов - амонафид и митонафид (см. рис. 5) действуют как ингибиторы топоизомеразы II, проявляют противоопухолевые свойства и были клинически испытаны, но не подошли к применению из-за нежелательных побочных эффектов [53].

Нафталендиимид содержит две линкерные группы (рис. 6), которые также связаны с имидными группами. Эти линкеры могут одновременно связываться с обоими желобками ДНК. По сравнению с нафталимидом нафталендиимиды имеют более высокое сродство к ДНК, что, в первую очередь, связано с их низкой диссоциацией. Эти вещества образуют ступенчато интеркалированные комплексы с ней, при этом приспособливаются к желобку ДНК, в котором находятся [54,55].

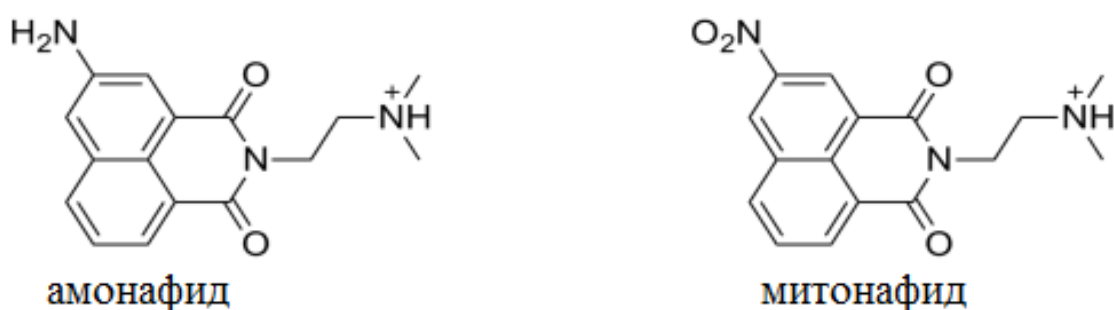


Рис. 5. Химическая структура нафталимидов амонафида и митонафида [8].

В большинстве случаев линкерные группы нафталендиимидов идентичны, что обуславливает их высокое сродство с ДНК и цитотоксичную

активность. В основном линкеры состоят из аминных групп, которые удаляются из имидных групп сердцевины нафталендиимидов, что обуславливает их более желательные свойства по сравнению с нафталимидами.

Аналогичные исследования проведены также с нафталендиимидами, которые содержат неидентичные линкерные группы. С этой точки зрения, изменение стерического объема между желобково-связывающимся субъединицами и модифицирование основанности аминной группы представляет определенный интерес [51,56-58]. Нафталендиимидные интеркаляторы предпочтительнее связываются с GC богатыми участками ДНК [50,54]. В последнее время широкое применение получил электрохимический метод детектирования взаимодействия ДНК с нафталендиимидами. Этот метод является быстрым, чувствительным и относительно доступным при анализе генома [59].

Такенака и соавторы модифицировали нафталендиимиды через линкерные имиды электрохимически активными функциональными группами для получения

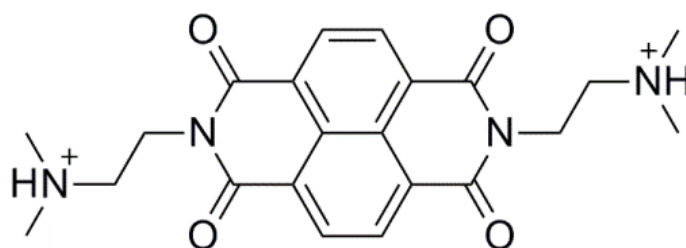


Рис. 6. Химическая структура нафталендиимида.

молекул с обратимыми редокс свойствами и для узнавания при их связывании с ДНК [60]. В частности, нафталендиимид, содержащий ферроценилы, связанные с обоими имидами, различает дц- и оц-ДНК при неожиданно низком лимите детекции для дц-ДНК [61-63]. Получены такие производные нафталендиимида, которые закрепляются в G-квадруплексах, при этом сердцевина нафталена связывается вверху от G-квартета, четыре линкеры (содержащиеся в

соответствующих производных нафталендиимида) связываются в бороздках и стабилизируют структуру G-квадруплекса в зависимости от температуры и, таким образом, ингибируют рост опухолевых клеток [64,65].

1.4.2. Бис-интеркаляторы

Бис-интеркаляторы содержат две интеркалирующие единицы, связанные с линкерами. При этом, линкеры бис-интеркаляторов связываются и с большим, и с малым желобком ДНК. Впервые бис-интеркаляторы были получены на основе нафталендиимида. Существуют также природные бис-интеркаляторы, среди которых эхиномицин, который является псевдосимметричным бициклическим пептидом (рис. 7). Линкеры эхиномицина предпочтительнее связываются с CpG последовательностями, окруженными AT парами в малом желобке ДНК.

Антибиотическое свойство эхиномицина обусловлено ингибированием транскрипции, поскольку этот бис-интеркалятор блокирует связывание транскрипционного гидроксия-индуцирующего фактора-1 (HIF-1) с гидроксия-познающим элементом (HRE), являющимся определенной последовательностью ДНК (этот процесс важен для выживания и пролиферации опухолевых клеток) [66,67]. Среди бис-интеркаляторов, представляющих клинический интерес и имеющих противоопухолевые свойства, можно отметить также MT02, состоящий из бис-нафталимидов (сердцевина) и линкера [12,68].

1.4.3. Полиинтеркаляторы

Некоторые исследования таких интеркаляторов фокусированы на акридиновых полиинтеркаляторах, которые конструированы наподобие “ожерелья” (рис. 8 а).

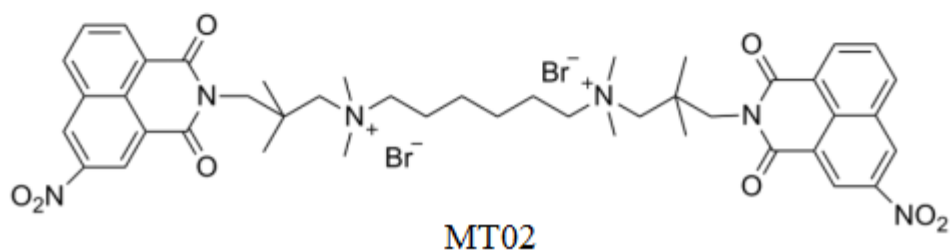
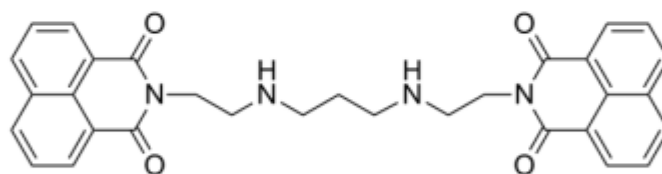
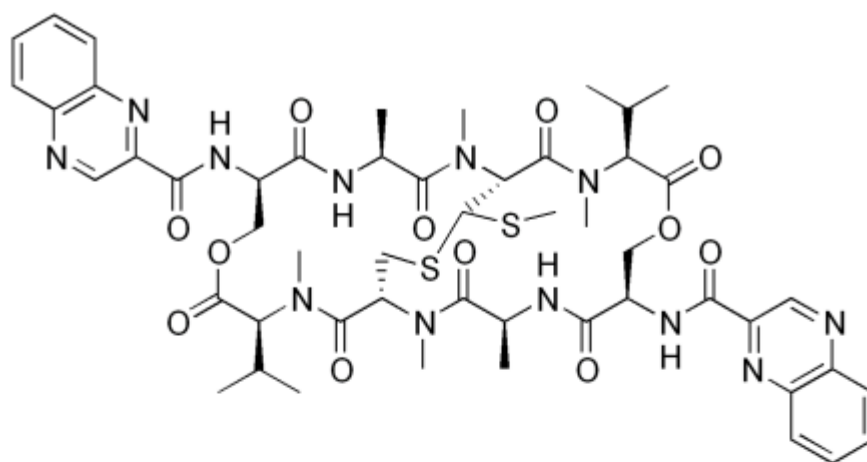


Рис. 7. Химическая структура некоторых бис-интеркаляторов.

Обнаружено небольшое увеличение сродства при переходе из акридинового димера (бис-интеркалятора) на тример (трис-интеркалятор), что указывает на то, что длина линкерной части и ее гибкость являются ключевыми при конструировании полиинтеркаляторов с высоким сродством к ДНК [70]. Например, показано высокое сродство состоящего из длинных, более гибких аминоалкильных линкеров, связанных с тремя акридиновыми группами, трис-интеркаляторов к poly[d(A-T)]. Этот трис-интеркалятор связывается с полинуклеотидом с константой ассоциации – $K=10^{14} \text{ M}^{-1}$, что соответствует очень низкой диссоциации [71]. Норден и соавторы исследовали структурно похожие, основанные на акридине моно-, бис-, трис-, тетра- и гекса-интеркаляторы. Они выявили, что моно-, бис- и трис-интеркаляторы связываются с ДНК как и следовало ожидать, в то время как в случае тетра- и гекса-интеркаляторов только три интеркалирующие единицы связываются с ней, в дальнейшем устанавливая, что для длинных полиинтеркаляторов необходима оптимизация линкерной части этих соединений [72]. Было также показано, что полиинтеркаляторы, в том числе тетра-интеркалятор с пептидным линкером и интеркалирующей единицей $[\text{Pt}(\text{tpy})(\text{py})]^{2+}$ (tpy – терпиридин, py – пиридин), хотя и связываются с ДНК, однако только две единицы интеркалируют, опять же из-за неоптимальной длины линкерной части [73].

Фар и соавторы с помощью молекулярного моделирования конструировали трис-интеркалятор наподобие “подвески” (рис. 9), содержащей порфириновый центральный интеркалирующий блок и две акридиновые интеркалирующие единицы, при этом, аргининовые плечи через гибкие линкеры с обеих сторон связывают эти акридиновые единицы с порфирином. Экспериментальные данные выявили трис-интеркаляцию этого соединения [74]. Неспецифическая природа полиинтеркаляторов даже используется в методах выделения ДНК.



Рис. 8. Полиинтеркаляторы с двумя различными типами связывания с ДНК:

а – полиинтеркалятор наподобие “ожерелья”, б - полиинтеркалятор, в котором интеркалирующие единицы связаны по принципу голова- к-хвосту [8].

В лаборатории Райса синтезированы полиакридин PEG-пептидные полиинтеркаляторы с тремя-, четырьмя- или пятью акридиновыми единицами (рис. 9), которые использованы для формирования обратимого, анионного открытого полиплекса с ДНК, при этом, эти полиплексы способны защитить ДНК от метаболической деградации [75].

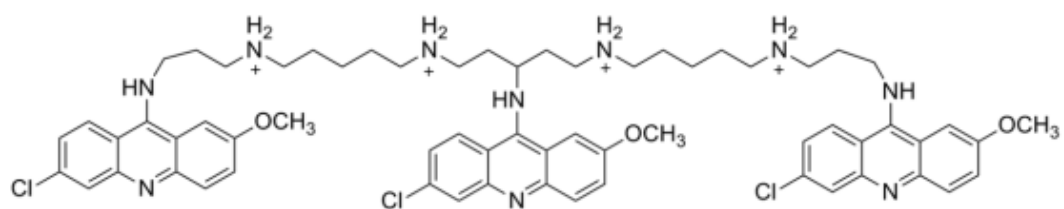
Выделение генетического материала с помощью этих анионных, открытых полиплексов многообещающий метод, несмотря на то, что некоторые вопросы все еще остаются нерешенными. В частности, непонятно, как эти системы выделения с помощью полиакридинов будут влиять на другие клеточные процессы [76].

Другой тип полиинтеркаляторов синтезирован в лаборатории Иверсона на основе нафталендиимида (НФД). Эти вещества называются ступенчатыми НФД-полиинтеркаляторами, в которых нафталендиимидовые единицы связаны друг с другом по принципу голова к хвосту (рис. 8). НФД-полиинтеркаляторы при ступенчатом связывании свиваются на ДНК как змея поднимается по лестнице (рис. 10).

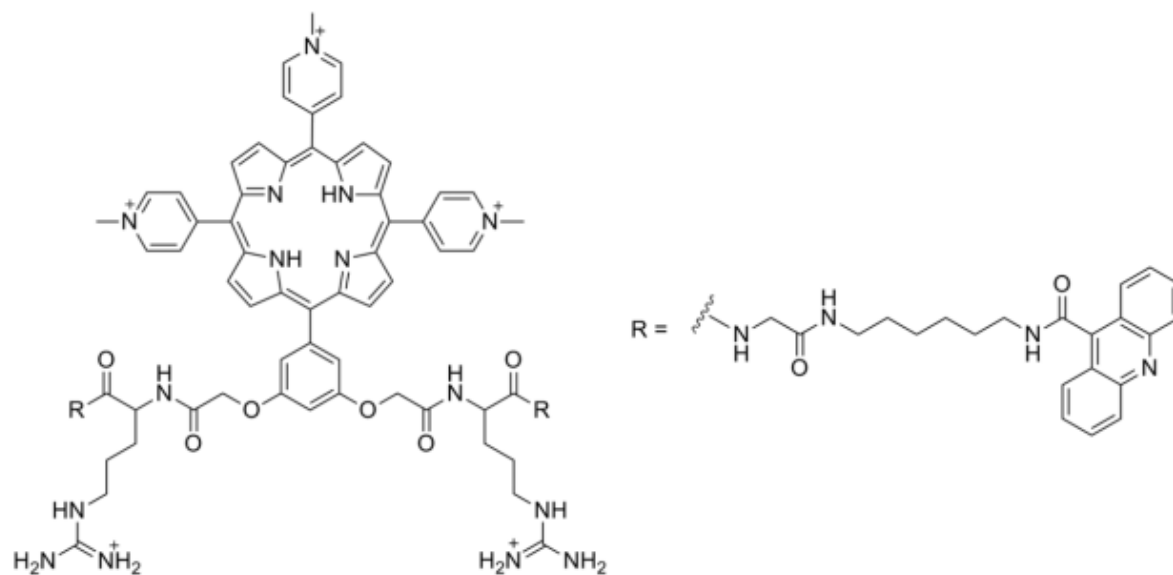
Этот полиинтеркалятор - первое соединение, которое было описано как тетра-интеркалятор, несмотря на то, что понимание молекулярной структуры способов связывания пока еще остается недоступной [77].

Эта концепция была расширена для синтеза и изучения связывания октаинтеркаляторов, что подразумевает связывание этого вещества с 16 парами оснований, при этом обнаружено предпочтение к ГЦ-богатым участкам ДНК [78]. Эти положительно заряженные НФД-пептидные соединения проявляют обнадеживающую антибактериальную активность по отношению как к грам-положительным, так и грам-отрицательным штаммам, несмотря на то, что и в данном случае их действие пока еще неясно [79].

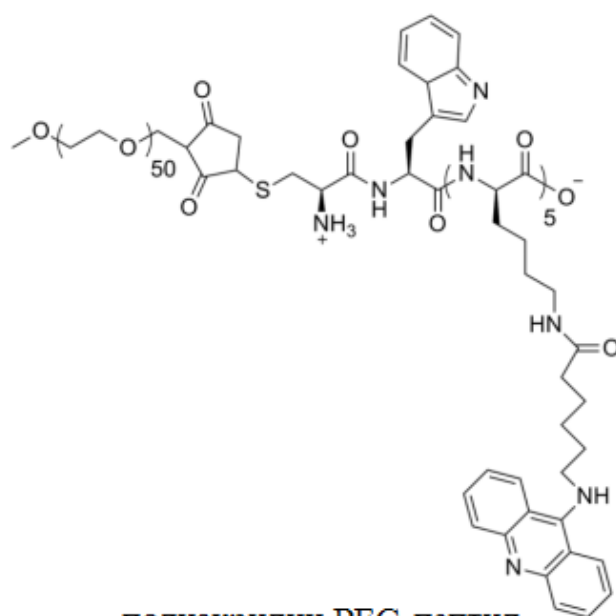
После того, как основной способ связывания полиинтеркаляторов был выяснен, Иверсон и соавторы изменили свое отношение к этим соединениям, начиная их рассматривать как структуры, распознающие определенные



акридин трис-интеркалятор



порфирин-акридин трис-интеркалятор



полиакридин PEG-пептид

Рис. 9. Химическая структура некоторых трис-интеркаляторов [8].

последовательности ДНК (специфические к определенным последовательностям соединения).

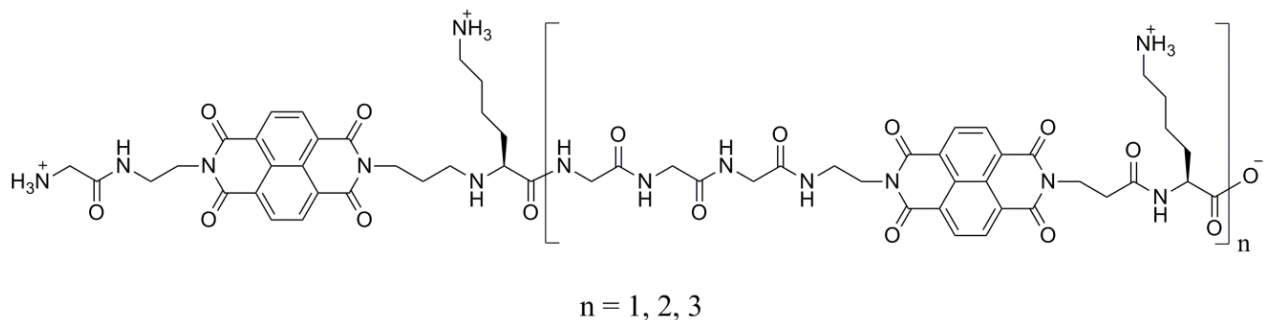


Схема 2. Структура НФД-полиинтеркалятора.

Одним из важных достижений в использовании НФД-полиинтеркаляторов то, что они легко синтезируются из нафталендиангибрида и первичного амина до дисубъединичного диимида, что можно использовать для синтеза несимметричных НФД [80-84]. Чу и сотрудники комбинировали линкеры Gly₃Lys-, связывающийся в большом, и β-Ala₃Lys-, связывающийся в малом желобках ДНК бис-интеркаляторов и получили макроциклический ступенчатый НФД бис-интеркалятор. Этот интеркалятор образует псевдокатенановую структуру при связывании с дц-ДНК (рис. 11). Этот циклический бис-интеркалятор предпочтительнее связывается с 5'-ГГТАЦЦ-3' последовательностями таким образом, что линкерные части попадают в указанные желобки ДНК, принимая во внимание то, что специфичность к данным последовательностям обусловлена более предпочтительным связыванием Gly₃Lys-линкера в большом желобке с указанной последовательностью, по сравнению со специфичностью к участку предпочтительного связывания β-Ala₃Lys-линкера [85-87].

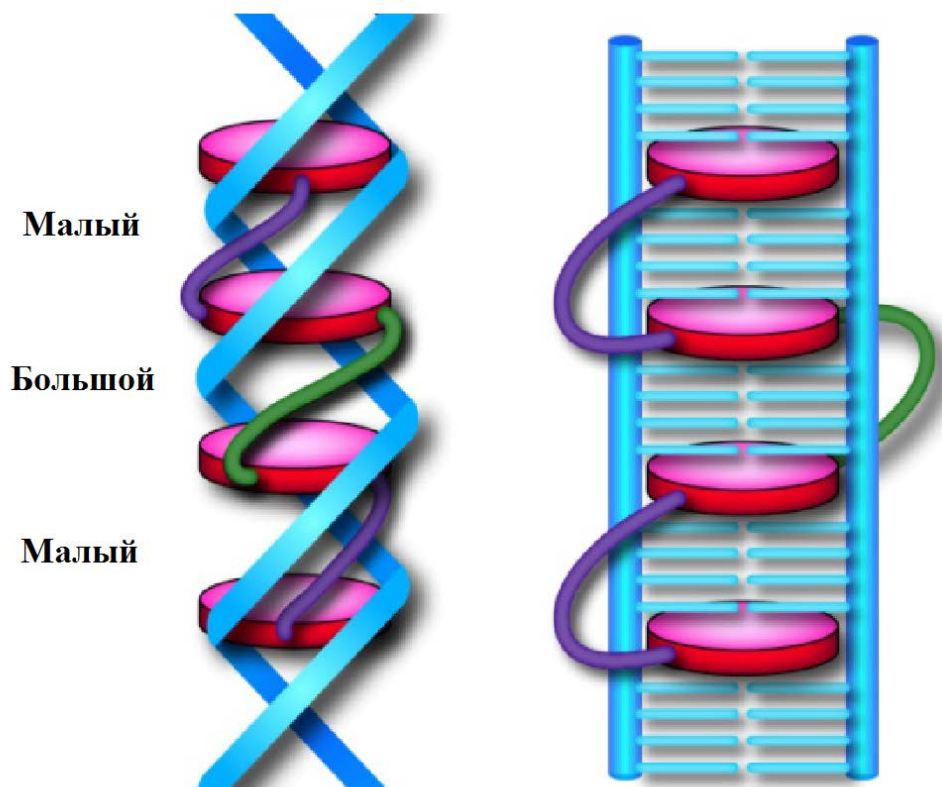


Рис. 10. Схема ступенчатой полиинтеркаляции лигандов в ДНК [8].

Была выдвинута интересная гипотеза, согласно которой этот циклический бис-интеркалятор способен сканировать предпочтительные участки связывания, скользя вверх и вниз вдоль ДНК и разрывая пары оснований до тех пор, пока не находит свой термодинамический минимум связывания. Аналогичное скольжение при связывании с ДНК предложено и для актиномицина Д и трис-интеркалирующих акридиновых полиинтеркаляторов [1,88].

Примечательно, что модулирование Gly₃Lys- и β-Ala₃Lys- бис-интеркаляторов применялось в конструировании НФД тетра-интеркалятора, специфичного к определенным последовательностям ДНК. Предвиделось, что этот тетра-интеркалятор будет связываться с ДНК, последовательно проникая через малый, большой и малый желобки [89]. Связанная часть этого соединения в малом желобке состоит из β-Ala₃Lys пептидного линкера. Однако связанная часть этого соединения в большом желобке состоит из адипиновой кислоты, линкерная часть которой совпадает с длиной гидрофобной Gly₃Lys-пептида, что дает симметрию второго порядка (C₂) этой молекуле. Специфический участок связывания для адипиновой кислоты состоит из 14 пар оснований и является последовательностью гибридного палиндрома, при этом, комплекс этого тетра-интеркалятора с 14 п.о. также имеет C₂ симметрию. Неожиданным является то, что адипиново-кислотный тетра-интеркалятор имеет 16-и дневный период полудиссоциации (полураспада) из своего участка связывания, что является рекордом для синтетических молекул, связывающихся с ДНК.



Рис. 11. Псевдокатенановая структура интеркаляции циклического бис-интеркалятора с ДНК [84].

1.5. ДНК-биосенсоры и ДНК-биочипы

Одной из современных направлений прикладного применения результатов экспериментальных исследований является развитие методов, изучающих молекулярное распознавание между молекулами нуклеиновых кислот (НК), НК и белков, НК и малых молекул. При разработке методов биоанализа особое внимание уделяется процессам взаимодействия ДНК с различными низкомолекулярными соединениями – лигандами естественного и синтетического происхождения. Эти методы в настоящее время широко применяются в различных областях науки, а также в хозяйстве [90-93]. Для биоанализа различных веществ созданы биочипы - революционное достижение биотехнологии последних лет. Необычное устройство позволяет за короткое время определять несколько тысяч аллергенов, онкогенов, различных биологически активных веществ, и даже генетических дефектов. Технология белковых биочипов, заменяющих целые иммунологические лаборатории, дает возможность в тысячи и десятки тысяч раз увеличить производительность большинства диагностических методов и резко снизить себестоимость анализов [94-98]. Биологические микрочипы (рис.12) (biochips) или, как их чаще называют — DNA microarrays, - это один из новейших инструментов биологии и медицины 21-го века. Изобретены биочипы были в конце 90-х годов в России и в США. В настоящее время они активно производятся несколькими биотехнологическими фирмами. Пробразом современных “живых чипов” послужил саутерн-блот, изготовленный в 1975 году Эдом Саутерном. Он использовал меченую нуклеиновую кислоту для определения специфической последовательности среди фрагментов ДНК, зафиксированных на твердой подложке [99].

Все более широкое применение в различных областях медицины, в том числе и фармакологии, находят микрочипы - диагностические (аналитические)

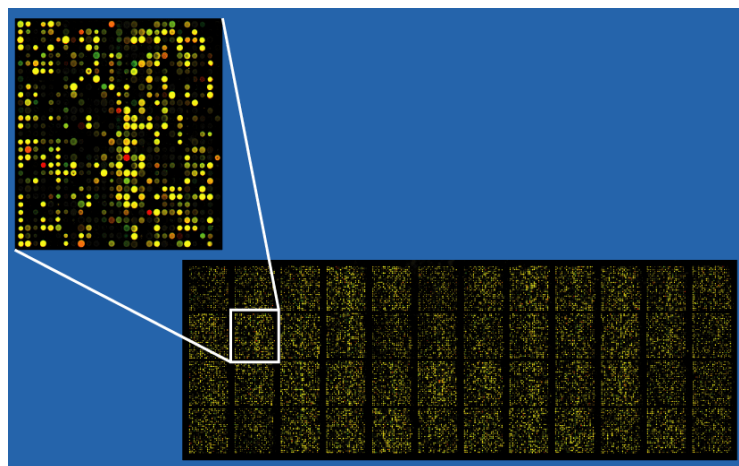


Рис. 12. Микрочип для 40000 проб, в котором каждая точка отображена псевдоцветом в соответствии с уровнем экспрессии соответствующего ей гена [99].

тест-системы, позволяющие проводить множество однотипных анализов одновременно. Имеется два основных типа микрочипов. Первый - микроматрицы различных соединений, главным образом биополимеров, второй тип - это «микролаборатории». Микрочипы первого типа позволяют диагностировать раковые заболевания, инфекции, выявлять у больных устойчивые к лекарствам формы возбудителей, чувствительность к аллергенам, оценивать эффективность лечения, прогноза течения заболевания. Фармацевтические фирмы и лаборатории с помощью биочипов проводят анализ работы десятков тысяч генов и сравнивают экспрессию этих генов в здоровых и в раковых клетках [100-102]. Это помогает в создании новых лекарственных препаратов и определении звеньев патологического процесса, на которые эти лекарства действуют. Биочип представляет собой матрицу - крохотную пластинку со стороной 5-10 миллиметров, на которую можно нанести до нескольких тысяч различных микротестов. Профессионалы называют этот носитель "платформой". Платформа - это чаще всего пластинка из стекла или пластика (иногда используют и другие материалы, например кремний), на которые наносятся биологические макромолекулы (ДНК, белки, ферменты), способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе. В зависимости от того, какие макромолекулы используются, выделяют различные виды биочипов, ориентированные на разные цели. Основная доля производимых в настоящее время биочипов приходится на ДНК-чипы (94 процента), то есть матрицы, несущие молекулы ДНК [94-102].

ДНК-микрочип используется для изучения экспрессии генов и поиска мутаций в биомедицинских исследованиях. Оставшиеся 6 процентов составляют белковые чипы. В этом смысле биологические чипы близки к электронным чипам, которые и базируются на кремниевых пластинах. Это организованное размещение занимает на платформе очень небольшой участок размером от почтовой марки до визитной карточки, поэтому в названии биочипов присутствует слово *micro*. Микроскопический размер биочипа

позволяет размещать на небольшой площади огромное количество разных молекул ДНК и считывать с этой площади информацию с помощью флуоресцентного микроскопа или специального лазерного устройства для чтения. И биологические микрочипы, и электронные собирают и обрабатывают огромное количество информации на малой поверхности. И те, и другие состоят из огромного количества идентичных миниатюрных элементов, размещенных рядом друг с другом, правда, ячейки биочипа по полупроводниковым меркам просто огромны - 100x100x20 микрометров. При этом действие электронного, компьютерного чипа основано на ответе “да-нет”, а биологический чип позволяет выбрать из миллионов или миллиардов возможностей единственно верную. Компьютерный чип производит миллионы математических операций в секунду, но и на биочипе за пару секунд проходят тысячи биохимических реакций [95-99].

Современные ДНК-микрочипы могут одновременно измерить экспрессию десятков тысяч генов у человека и выявить около миллиона мутаций. Механизм действия микрочипа для изучения экспрессии генов состоит в следующем. Активная работа гена в данной ткани выражается в накоплении его матричной РНК (мРНК). Все мРНК экстрагируются из образца ткани, и с помощью фермента обратной транскриптазы на них синтезируется так называемая комплементарная ДНК (кДНК), которая значительно устойчивей и удобней в работе, чем мРНК (рис. 13). Полученный набор кДНК метят с помощью флуоресцентных или радиоизотопных меток. Содержание индивидуальных кДНК в образце прямо пропорционально содержанию их мРНК-матриц и, следовательно, уровню активности соответствующих генов. Смесь кДНК наносят на микрочип, в каждой точке которого пришиты ДНК-фрагменты, соответствующие кодирующей последовательности одного из генов. кДНК находят «свои» точки и связываются (гибридизуются) с ними по принципу комплементарности. Чем больше в растворе кДНК данного вида, тем больше молекул прикрепляется к своей точке [94-96].



Рис. 13. Схематическое изображение механизма действия ДНК-чипа. На поверхности чипа иммобилизованы олигонуклеотиды. При добавлении анализируемого образца комплементарная таргетная ДНК в образце формирует дуплекс с олигонуклеотидом на чипе (в центре). В результате генерируется сигнал, свидетельствующий о наличии в пробе соответствующего объекта (инфекции, онкомаркера и т. п.) [96].

При взаимодействии биочипа с исследуемым образцом, предварительно обработанным светящимся (флуоресцентным) красителем, в соответствующих ячейках происходит химическая реакция, и тогда эти ячейки начинают светиться тем сильнее, чем интенсивнее процесс. Затем специальное сканирующее устройство определяет содержание кДНК в каждой точке микрочипа, а программа соотносит его с названием гена, представленного данной точкой [94-96]. Результатом ДНК-микрочипового исследования является матрица из точек, интенсивность которых прямо пропорциональна активности соответствующих генов.

ДНК зонд является фрагментом ДНК, меченным тем или иным образом и используемым для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК. Этот фрагмент позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности. При температуре 94–100°C ДНК диссоциирует на 2 цепи и этот процесс обратим: при температуре 65°C происходит восстановление структуры двойной спирали - ДНК-гибридизация (ренатурация). Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями, если они комплементарны: ДНК–ДНК, РНК–РНК, ДНК–РНК. На основе гибридизации осуществляют анализ с помощью ДНК-чипов: аналитические (детектирующие) ДНК-зонды гибридизуются со специфическими последовательностями нуклеиновых кислот и таким образом выявляют их в исследуемых образцах. Флуоресцентно-меченные зонды используются для проведения ПЦР в реальном времени, позволяющей детектировать количество ДНК в исследуемом образце. Также флуоресцентные зонды используются при проведении флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH — Fluorescence *in situ* hybridization) — цитогенетического метода, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на хромосомах. В нанотехнологии ДНК-зонды используются при создании детектирующих систем нового поколения (ДНК-наночипы) [94-102].

Улучшение и повышение эффективности биочипов и биосенсоров на основе ДНК связано с применением комплексов ДНК с лигандами. Этот вопрос становится актуальным в связи с тем, что ДНК-биосенсоры функционируют как поверхностный рецептор. Одной из важнейших направлений приготовления данных биосенсоров является улучшение селективности и чувствительности этих “приборов”, что будет способствовать возрастанию электрического сигнала и стабильности пробной мишени. Стабильность ДНК в биосенсоре строго зависит от условий среды: рН, ионная сила, лиганды и т.д. Селективность, а также чувствительность ДНК-сенсоров можно увеличить используя электрохимически активные соединения с более высоким сродством к ДНК. Такие соединения могут увеличить стабильность ДНК, в то же время и амплитуду генерированного сигнала, что может приводить к возрастанию чувствительности ДНК-биосенсора. Среди таких лигандов важное место занимают интеркаляторы, которые, имея плоскую гетероциклическую структуру, хорошо подходят к нуклеиновым кислотам и меняют локальную структуру ДНК [103]. С этой точки зрения исследования комплексов ДНК-лиганд являются важными в контексте развития ДНК-биосенсоров – обнаруживая эффект влияния лигандов на ее термодинамику и кинетику расплетания.

ГЛАВА 2

ТЕОРИЯ ПЕРЕХОДА СПИРАЛЬ-КЛУБОК КОМПЛЕКСОВ ДНК С МУЛЬТИМОДАЛЬНЫМИ ЛИГАНДАМИ

2.1. Теоретическое исследование плавления комплексов ДНК с мультимодалными интеркаляторами

Исследования по взаимодействию лигандов с ДНК представляют большой интерес уже более полувека. Целью этих исследований явилось определение стабилизирующего или дестабилизирующего влияния различных факторов на различные конформации ДНК. Исследования в этом направлении привели к выделению и синтезу огромного числа биологически активных соединений (см. Главу 1) и определению их механизмов связывания с ДНК. Эти исследования также позволили построить теоретические модели комплексообразования различных лигандов с ДНК. С этой точки зрения пионерскими являются первые модели комплексов ДНК с интеркаляторами, имеющими прикладное значение, в частности, с БЭ, АМД и др. [104-112]. Анализ экспериментальных данных по взаимодействию этих интеркаляторов с В-формой ДНК выявил два способа связывания - "сильный" и "слабый" [104]. Поэтому была рассмотрена теоретическая модель, в которой учитывали два способа комплексообразования некоторых биологически активных низкомолекулярных веществ (лигандов) со спиральной ДНК [105-107]. Однако все попытки получить набор реальных термодинамических параметров взаимодействия исследованных лигандов – АМД, БЭ и др., а также ионов тяжелых металлов с ДНК, которые бы дали хорошее согласование разработанной теории с экспериментом, не увенчались успехом [3,108]. Надо полагать, что наблюдаемая несогласованность 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.), отличающимися 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 двунитовой [109-112], но и с одонитовой ДНК, а также с РНК [113,114]. Этот факт не учитывался ни в одной из ранее рассмотренных теоретических моделей.

Следовательно, возникает необходимость рассмотрения такой теоретической модели, в которой учитывается мультимодальное взаимодействие с различными (например, дц- и оц-) формами ДНК в конкретно рассматриваемом кооперативном переходе (В-клубок, В-А, В-Z и др.).

Суть предлагаемой теории заключается в следующем (рис. 14). Пусть в растворе имеются молекулы полимера в двух различных формах, со значениями числа пар 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:

$$N_1 + N_2 = N. \quad (2.1)$$

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

$$k = k_0 + \sum_{i=1}^l k_i + \sum_{j=l+1}^m k_j. \quad (2.2)$$

Если r_i ($i = \overline{1, l}$) – число пар оснований, приходящихся на одно место связывания с одной из форм полинуклеотида, а r_j ($j = \overline{l+1, m}$) – 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. С учетом вышеуказанных предположений для “неравновесной” свободной энергии системы можно написать:

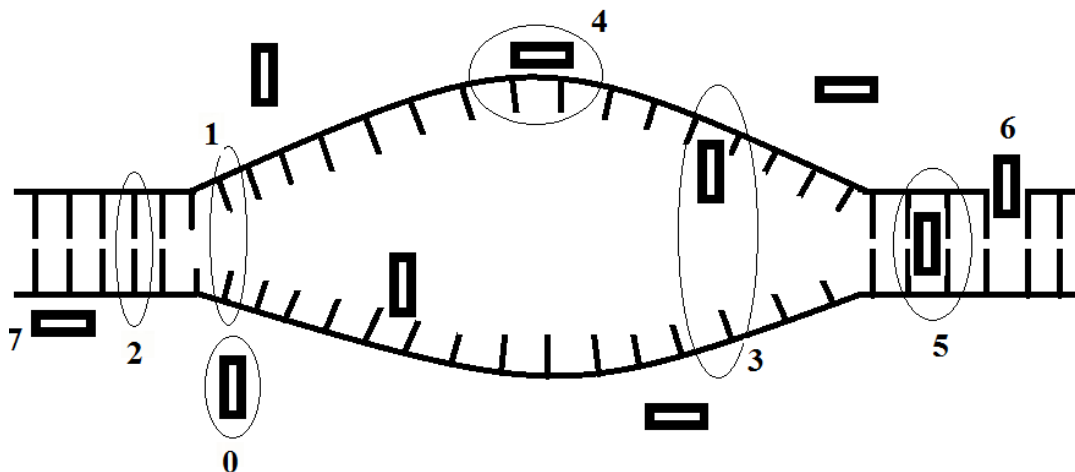


Рис. 14. Схематическое изображение ДНК с лигандами в интервале перехода. 0 – “свободный” лиганд, 1 – разорванная пара, 2 – связанная пара, 3 – разорванные пары с “сильно” взаимодействующим лигандом, 4 – разорванная пара с “слабо” взаимодействующим лигандом, 5 – связанные пары с интеркалированным лигандом, 6 – полуинтеркаляционное связывание лиганда с дц-участком, 7 – связывание лиганда вдоль цепи двухспирального полинуклеотида с внешней стороны.

$$F = \varepsilon_1 N_1 + \varepsilon_2 N_2 + \varepsilon_0 n + \psi_0 k_0 + \sum_{i=1}^l \psi_i k_i + \sum_{j=l+1}^m \psi_j k_j - T [\ln W(N_1, n) + \ln W(N_2, n) + \ln W(N_0, k_0) + \sum_{i=1}^l \ln W\left(\frac{N_1}{r_i}, k_i\right) + \sum_{j=l+1}^m \ln W\left(\frac{N_2}{r_j}, k_j\right)], \quad (2.3)$$

где ε_1 и ε_2 – свободные энергии участков соответствующих форм ДНК, рассчитанные на одну пару оснований, ψ_i и ψ_j – свободные энергии связи скрепки с участками соответствующих форм молекул.

Каждой границе между звеньями двух форм, на которые разбивается вся молекула в интервале перехода, приписывается энергия $\varepsilon_0/2$, что позволяет учитывать взаимодействие между соседними звеньями.

При $N \gg 1$ (тем самым можно пренебречь концевыми эффектами) вместо уравнения (2.3) получим:

$$F = \varepsilon_1 N_1 + \varepsilon_2 N_2 + \varepsilon_0 n + \psi_0 k_0 + \sum_{i=0}^m \psi_i k_i + T \ln \left\{ \frac{N_1!}{n!(N_1 - n)!} \cdot \frac{N_2!}{n!(N_2 - n)!} \times \prod_{i=1}^l \frac{(N_1 / r_i)!}{k_i!(N_1 / r_i - k_i)!} \cdot \prod_{j=l+1}^m \frac{(N_2 / r_j)!}{k_j!(N_2 / r_j - k_j)!} \right\} \quad (2.4)$$

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 (2.2) примет вид:

$$D = c_0 + \frac{P}{2} (1 - \vartheta) \sum_{i=1}^l c_i + \frac{P}{2} \vartheta \sum_{j=l+1}^m c_j. \quad (2.5)$$

При условии постоянства полной энергии системы:

$$E = \varepsilon_1 N_1 + \varepsilon_2 N_2 + \varepsilon_0 N_0, \quad (2.6)$$

С помощью некоторых преобразований (они не приводятся), найдем выражения для изменений температуры и ширины интервала перехода под воздействием скрепок:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{\Delta H} \ln \left[\frac{\prod_{i=1}^l (1 - c_i r_i)^{1/r_i}}{\prod_{j=l+1}^m (1 - c_j r_j)^{1/r_j}} \right]_{\theta=0,5}, \quad (2.7)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = -\frac{1}{\Delta H} \left[\frac{\partial}{\partial \theta} \ln \frac{\prod_{i=1}^l (1 - c_i r_i)^{1/r_i}}{\prod_{j=l+1}^m (1 - c_j r_j)^{1/r_j}} \right]_{\theta=0,5}, \quad (2.8)$$

где для изменения температуры $\delta(1/T_m)$ и ширины интервала перехода $\delta(\Delta T/T_m^2)$ введены следующие обозначения:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_m}; \quad \delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = \frac{\Delta T}{T_m^2} - \frac{\Delta_0 T}{T_m^2}, \quad (2.9)$$

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.

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

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),

$$K_q = \frac{c_q r_q}{c_0 (1 - c_q r_q)}, (q = l, \dots, m) \quad (2.10)$$

и если x_1^0 есть решение уравнения при $\theta=0,5$ (θ – степень спиральности):

$$1 - \theta \sum_{i=1}^l \frac{p_i}{r_i (x_i + 1)} + \theta \sum_{j=l+1}^m \frac{p_j}{r_j (x_j + 1)} = c \quad (2.11)$$

где $x_1^0 = p_i x_i$ ($i=2, m$), то получаются формулы:

$$\delta \frac{1}{T_m} = \frac{1}{\Delta H} \ln \left[\frac{\prod_{j=l+1}^m (x_1^0 + p_j)^{1/r_j}}{\prod_{i=1}^l (x_1^0 + p_i)^{1/r_i}} (x_1^0)^{\sum_{i=1}^l \frac{1}{r_i} - \sum_{j=l+1}^m \frac{1}{r_j}} \right], \quad (2.12)$$

$$\delta \frac{\Delta T}{T_m^2} = \frac{1}{\Delta H} \left[\sum_{j=l+1}^m \frac{p_j}{r_j x_1^0 (x_1^0 + p_j)} - \sum_{i=1}^l \frac{p_i}{r_i x_1^0 (x_1^0 + p_i)} \right] \cdot \left. \frac{\partial x_1^0}{\partial \mathcal{G}} \right|_{\mathcal{G}=0,5}. \quad (2.13)$$

Соотношения (2.12) и (2.13) описывают многопараметрическую зависимость изменения температуры и ширины интервала перехода от концентрации лигандов (мультимодалный лиганд). Они дают возможность определить термодинамические константы комплексообразования таких лигандов с ДНК (m, l, r_i, K_i), что может быть достигнуто путем подбора таких значений набора параметров, при которых имеет место наилучшее согласование теории с экспериментом.

Предложенная теория феноменологичная и включает некоторые параметры, которые можно определить экспериментально. Число теоретических параметров зависит от числа типов связывания мультимодалных лигандов к каждой форме ДНК (если тотальное число типов связывания m , то число параметров связывания равняется $2m$).

2.1.1. Параметры теории

Значения термодинамических параметров, использованных в данной теории позволяют лучше понимать физическую природу конформационных переходов ДНК и ее комплексов с мультимодалными лигандами. Так, одним из важных параметров является изменение энтальпии перехода.

Энтальпия перехода спираль-клубок ΔH . Прямой метод определения энтальпии конформационных превращений ДНК – это микрокалориметрия, с помощью которой ΔH перехода спираль-клубок (B-, A-, B-Z) была получена в

работах [109-119]. Другим подходящим методом является “скрепочная” калориметрия, в основе которой лежит плавление комплексов ДНК с лигандами [3,108].

Формулы (2.12) и (2.13) дают возможность получить универсальную формулу для определения из эксперимента одной из важных параметров теории - ΔH [115]. При условии, когда $c \ll 1$ или когда $K_i p \gg 1$ или $K_i p \gg 1$, где ΔH – значение изменения энтальпии перехода системы, C – концентрационное соотношение D/P (D – концентрация лиганда, P – концентрация фосфатных групп на пару оснований). $p_q = K_q / K_1$, где K_1 – константа первым (по произвольному выбору) способом связывания лиганда с одной из форм (дц- или оц-), ДНК, K_q – константа связывания q способом ($q=2, \dots, m$) и определяется по формуле:

$$\Delta H = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\delta(\Delta T)}{[\delta T_m]^2} T_0^2 c \quad (2.14)$$

где $\delta T_m = T_0 - T_m$, $\delta(\Delta T) = \Delta T - \Delta_0 T$, c – относительная концентрация лиганда. Формула примечательна тем, что она не зависит от K и r связывания лиганда с ДНК и экспериментально определяя величины $\delta(\Delta T)$ и $\delta(T_m)$, можно вычислить ΔH . Значение ΔH зависит от концентрации лиганда, поэтому, основываясь на рис. 15 мы заключаем, что для точности определения изменения энтальпии в случае мультимодального лиганда единственным требованием является условие $c \rightarrow 0$. С помощью этого метода получены значения ΔH для плавления ДНК в зависимости от концентрации Na^+ и GC-содержаниями 31% и 72%:

$$\begin{aligned} \Delta H_{31\%(\text{GC})} &= 10900 + 1200 \lg[\text{Na}^+], \\ \Delta H_{72\%(\text{GC})} &= 11000 + 1100 \lg[\text{Na}^+]. \end{aligned} \quad (2.15)$$

В дальнейшем, для анализа экспериментальных данных, мы будем использовать полученные этим способом данные для ΔH .

Энтропия перехода спираль-клубок - ΔS : Изменение энтропии перехода спираль-клубок ДНК можно рассчитать из уравнения, учитывая, что в точке

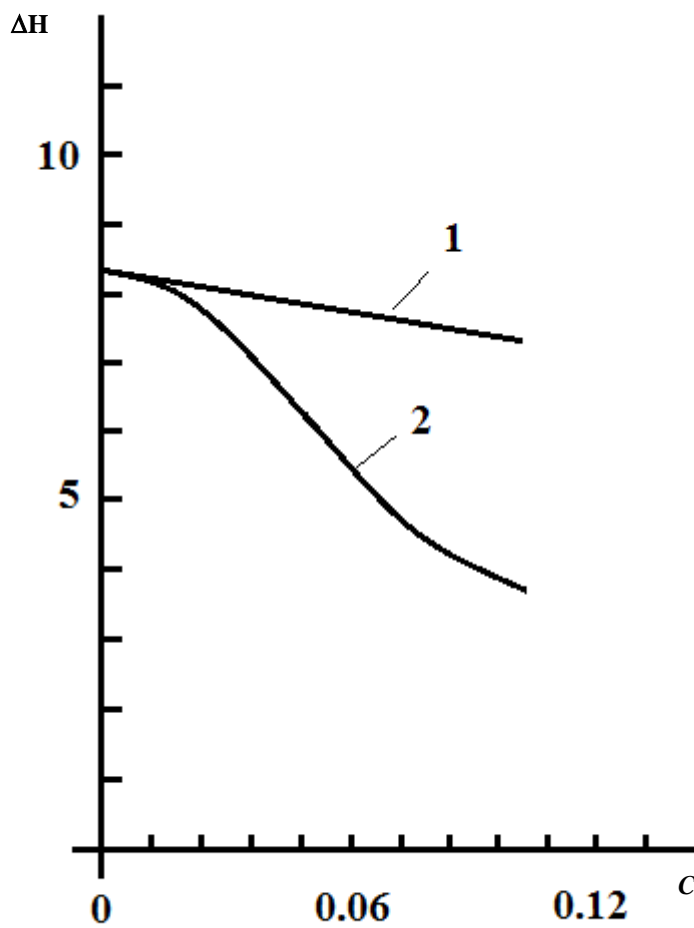


Рис. 15. Зависимость ΔH от концентрации лиганда – C . Значение ΔH рассчитано по (2.14). 1 – для бимодального, 2 – для мультимодального лиганда. В случае мультимодального лиганда кривые 1 и 2 совпадают только при $C \approx 0$.

перехода (T_0) свободная энергия на границе фаз спиральной и клубкообразной форм равна нулю. Следовательно:

$$\Delta G = \Delta H - T_0 \Delta S = 0 \quad (2.16)$$

Основываясь на значении ΔH , определенном из (2.14), можно рассчитать ΔS :

$$\Delta S = \Delta H / T_0$$

Размер участка связывания r_q (число пар оснований ДНК, соответствующих участку связывания) и отношение констант связывания $p_q = K_q / K_1$. Два параметра, характеризующие равновесное связывание - r_q и p_q , можно получить из кривых связывания в отложении Скетчарда, которое выражается зависимостью r/C_f от r , где r – отношение концентрации связанного лиганда к концентрации ДНК, C_f – концентрация свободных молекул лиганда.

Кривые связывания нелинейные для лигандов, взаимодействующих с идентичными, независимыми местами на ДНК, при этом, отрезок, отсекаемой на оси абсцисс равен r , а отрезок на оси ординат, отсекаемой этими кривыми, равен K . Для многих лигандов (БЭ, АМД и др.) кривые связывания в отложении Скетчарда нелинейные. При этом возможны две разные модели взаимодействия. Первая – когда имеются по крайней мере два способа связывания с независимыми идентичными участками, и вторая – взаимодействие между участками связывания. Отличить друг от друга эти модели трудно. Наша теория предлагает другой метод определения параметров связывания лигандов с ДНК. Метод заключается в следующем: уравнения (2.11) и (2.12) представлены зависимостью изменения $\delta(1/T_m)$ и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от c . В присутствии лиганда температура перехода комплекса (T_m) может увеличиваться (стабилизация) или уменьшаться (дестабилизация). Однако из-за перераспределения молекул лиганда между соответствующими формами ДНК в интервале перехода зависимость ΔT от концентрации скрепок носит колоколообразный характер. Сравнение ранее полученных экспериментальных данных по плавлению комплексов ДНК с БЭ и АМД с теорией дало возможность установить, что

исследуемые лиганды связываются с ДНК по крайней мере пятью способами, три из которых с нативной ДНК (два “сильных”, один “слабый”) и два – с однонитевой (“сильный” и “слабый”). Удалось теоретически оценить величины термодинамических параметров – константы связывания K и числа мест связывания n этих взаимодействий.

Другим выводом разработанной теории является то, что $\delta(\Delta T/T_m^2)=0$, если удовлетворяются условия

$$\sum_{i=1}^l \frac{1}{r_i} > \sum_{j=l+1}^m \frac{1}{r_j} \text{ и } \sum_{i=1}^l \frac{p_i}{r_i} < \sum_{j=l+1}^m \frac{p_j}{r_j}. \quad (2.16)$$

Уравнения (2.16), вместе с (2.10) в точке перехода дают

$$\sum_{i=1}^l c_i = \sum_{j=l+1}^m c_j. \quad (2.17)$$

Уравнение (2.17) показывает, что ширина интервала плавления ΔT комплексов ДНК с мультимодальными лигандами становится равной $\Delta_0 T$ чистой ДНК, когда общие концентрации лиганда на обеих формах ДНК равны в точке перехода ($\theta=0,5$). Дальнейшее увеличение концентрации лиганда приводит к резкому возрастанию $\delta(\Delta T/T_m^2)$ после насыщения мест связывания на одной из форм ДНК, когда места связывания на другой форме ДНК еще не насыщены. В этом случае $\delta(1/T_m)$ уменьшается. Результаты независимых опытных данных (они приведены в третьей главе) подтвердили эти предсказания теории.

Наша теория предлагает упрощенный метод для определения параметров связывания БЭ, АМД с ДНК. Уравнения (2.11) и (2.12) отражают зависимости изменений температуры плавления $\delta(1/T_m)$ и интервала плавления $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от концентрации лиганда. Формы обеих кривых очень чувствительны к изменениям значений r . При этом, в присутствие лиганда точка перехода может увеличиваться или уменьшаться. В обоих случаях должен иметь место эффект уширения кривых плавления. Уширение интервала перехода происходит из-за перераспределения лигандов между соответствующими формами биополимера

в течение перехода спираль-клубок. Формы зависимостей изменений ширины интервала плавления $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от концентрации лиганда c , очень различны в зависимости от теоретических параметров.

2.1.2. Сравнение теории с экспериментом

Уравнения (2.12) и (2.13) учитывают мультимодальное связывание лигандов с различными формами ДНК. Они содержат некоторые параметры, которые можно найти, если сравнить теорию с экспериментом. Рис. 16 показывает сравнение теоретических и экспериментальных кривых зависимостей $\delta(1/T_m)$ и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от полной концентрации лиганда (см. (2.12) и (2.13)). Кривые плавления ДНК-лиганд комплексов в случае БЭ и АМД для соответствующих концентрациях лигандов подобны при 10^{-2} М Na^+ , следовательно, полученные из сравнения значения параметров одинаковы в этих условиях для обоих лигандов [1]. Анализ полученных данных показывает, что при выбранных экспериментальных условиях (10^{-2} М Na^+) 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.

При низкой ионной силе эффект стабилизации БЭ и АМД двуспиральной конформации ДНК становятся различными. При уменьшении концентрации Na^+ до ($2 \cdot 10^{-3}$ М) резко увеличивается максимум зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от концентрации БЭ, в то время как для АМД максимум практически остается неизменным (рис. 17). Теоретический анализ ранее полученных экспериментальных данных при помощи нашей теории позволил оценить значения термодинамических параметров взаимодействия БЭ и АМД с ДНК при двух ионных силах.

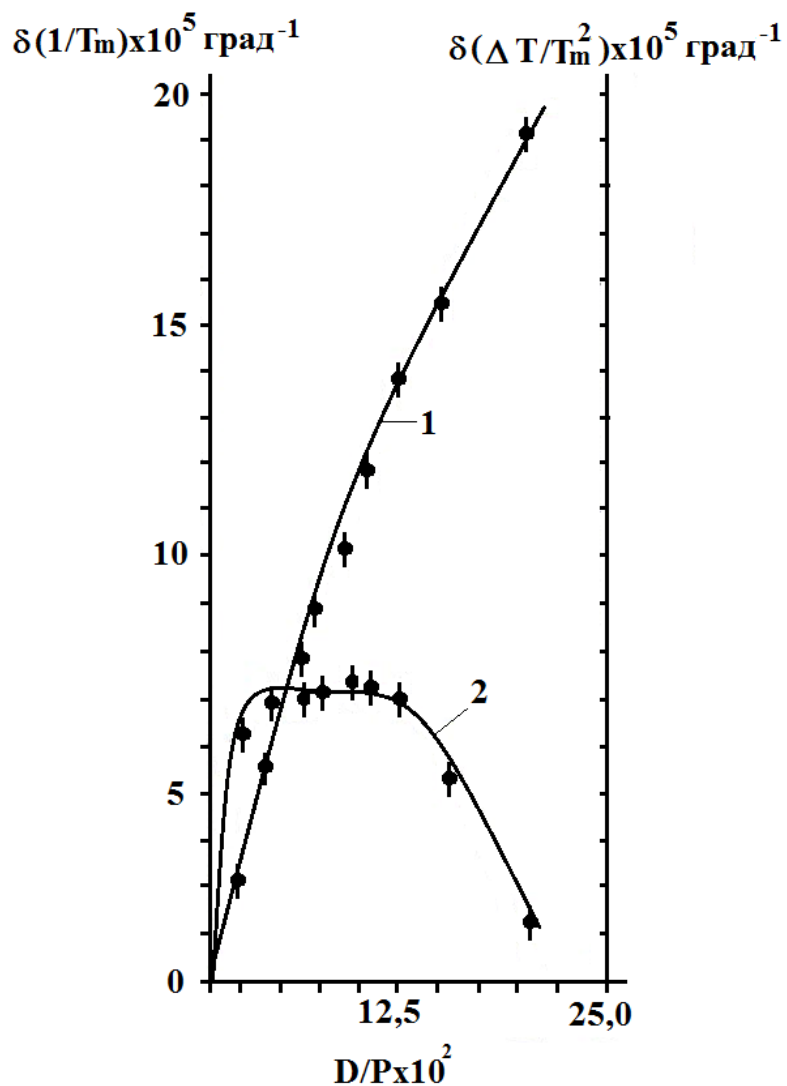


Рис. 16. Зависимости изменений температуры $\delta(1/T_m) \times 10^5 \text{ град}^{-1}$ – (1) и ширины интервала $\delta(\Delta T/T_m^2) \times 10^5 \text{ град}^{-1}$ – (2) перехода спираль-клубок от общей концентрации лиганда (D/P) при $m=5$, $l=3$, $\Delta H = -8,5 \text{ ккал/моль}$, определенные формулами (2.12) и (2.13). $p_1=1,0$; $p_2=5,0$; $p_3=4,2$; $p_4=5,5$; $p_5=200,0$; $r_1=3,0$; $r_2=10,0$; $r_3=5,0$; $r_4=6,75$; $r_5=12,0$; $\mu=1 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, $pH 7,0$.

Параметр r_q в два раза больше размера участка связывания как для двухцепочечной, так и одноцепочечной ДНК, так как этот параметр получен для точки перехода. Поэтому, для определения числа пар оснований n , приходящихся на одно место связывания на дц- и оц-ДНК, величину r_q необходимо уменьшить в два раза. Совпадение значений параметров связывания БЭ и АМД при 10^{-2} М Na^+ вовсе не означает, что механизм связывания этих лигандов с ДНК одинаков, однако подтверждает тот факт, что все участки связывания на полинуклеотиде практически одинаковы для различных (но не всех) интеркаляторов [120]. Более того, основная модель взаимодействия АМД с ДНК включает интеркаляцию с высокой специфичностью к GC-участкам, в результате которой шесть пар оснований блокируются молекулой лиганда в узком желобке двойной спирали [112].

Кроме того, полученные нами данные хорошо согласуются с фактом, что только ограниченное число последовательностей являются центром связывания “сильным” способом (центральный GC-участок для АМД и пиримидин-пуриновые последовательности для БЭ), и эти участки насыщаются при низком соотношении лиганд/ДНК. При высоком же соотношении БЭ/ДНК (примерно 0,25 и больше) связывание “слабым” способом является результатом электростатического взаимодействия между электроотрицательными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными молекулами лиганда. Так, показано, что для АМД существует более чем 14 способов связывания с ДНК, только один из которых имеет сильное сродство к изолированному 5'-GC-3' участку [109,115]. Показано также, что константа связывания лиганда с соседствующими центральной GC паре последовательностями меньше в 20 раз по сравнению с изолированными GC-основаниями [115]. Более того, комплекс АМД с изолированным GC-участком намного термостабильнее по сравнению с комплексом АМД-ДНК [115,120-122].

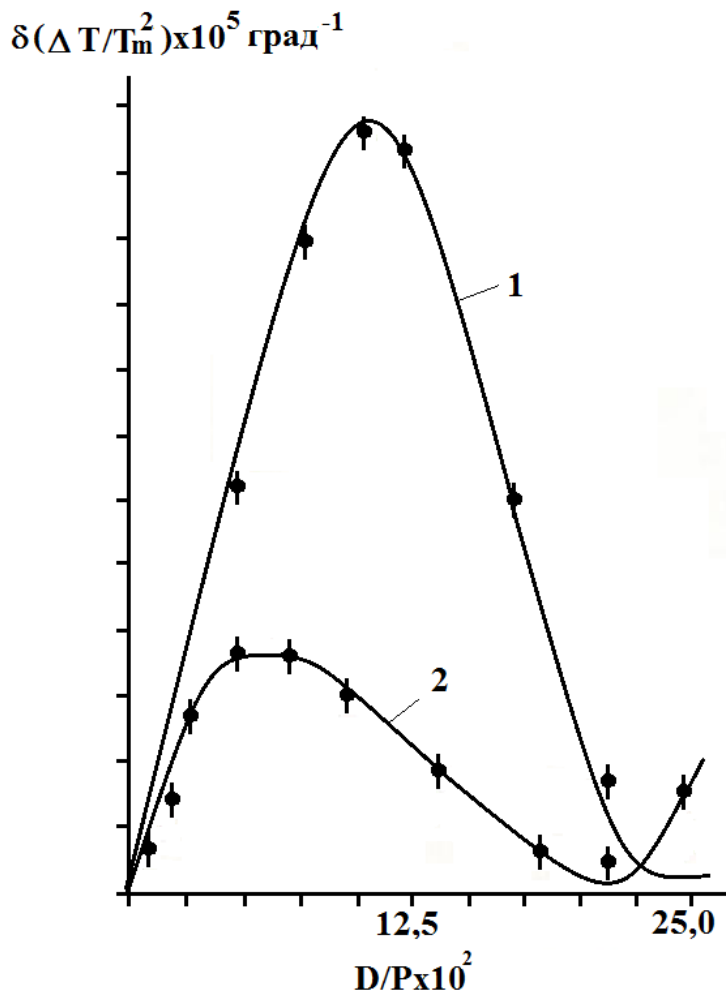


Рис. 17. Зависимости ширины интервала перехода $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от полной концентрации БЭ (1) и АМД (2), рассчитанные с помощью ур. (2.13) при значениях параметров для БЭ - $m=7$, $l=4$, $\Delta H= -7,6$ ккал/моль и $r_1=3,0$; $r_2=10,0$; $r_3=2,0$; $r_4=5,0$; $r_5=6,75$; $r_6=12,0$; $r_7=2,0$; $p_1=1,0$; $p_2=1,2$; $p_3=0,01$; $p_4=10,0$; $p_5=15,0$; $p_6=120,0$; $p_7=0,02$ и для АМД - $m=6$, $l=4$, $\Delta H= -7,6$ ккал/моль и $r_1=3,0$; $r_2=6,0$; $r_3=6,0$; $r_4=7,0$; $r_5=12,0$; $r_6=4,0$; $p_1=1,0$; $p_2=1,5$; $p_3=4,2$; $p_4=5,5$; $p_5=160,0$; $p_6=0,1$. Точками отмечены экспериментальные значения для комплексов БЭ (кривая 1) и АМД (кривая 2) с ДНК CD фага полученные при $2 \cdot 10^{-3}$ М Na^+ , $\text{pH}=7,0$. Приводятся величины среднеквадратических отклонений.

Таким образом, обнаруженные с помощью теоретического анализа 3 типа связывания при ионной силе раствора 10^{-2} М и 4 типов - при ионной силе $2 \cdot 10^{-3}$ М, при взаимодействии БЭ и АМД с дц-ДНК, подтверждается результатами независимых исследований. В настоящее время не существует однозначных данных, показывающих мультимодальность связывания лигандов с оц-ДНК. Все литературные данные относятся к измерениям при 25°C , где существование дц-участков очевидно. Однако можно подбирать последовательности нуклеотидов, в которых не образуются дц-участки [123]. Эти исследования показали, что АМД может связываться “полуинтеркаляционным” способом с оц-ДНК. Этот факт косвенно подтверждает вывод теории о, по крайней мере, двух способах взаимодействия АМД с оц-ДНК.

2.2. Флуктуации при переходе порядок – беспорядок в комплексах ДНК-лиганд, использующих различные механизмы связывания

Явление перехода спираль-клубок в биополимерах известно начиная с 1960-х годов [3,4] и до сих пор продолжает активно исследоваться. Такой неослабевающий интерес обусловлен двумя факторами. С биологической точки зрения разворачивание двойной спирали ДНК связано с такими генетически важными процессами, как транскрипция и трансляция. С физической точки зрения, двойная спираль ДНК является примером одномерной кооперативной системы с крупномасштабными корреляциями [4].

Теория переходов порядок – беспорядок в ДНК, в частности рассматривалась в работах [107,116,124-127]. При исследовании структуры и функции ДНК особенно важными являются взаимодействия с водой, ионами и низкомолекулярными соединениями, растворенными в воде (лигандами). Эффект таких взаимодействий, в частности исследовался в работах [116-118,128-131]. Взаимодействие лигандов с двойной спиралью ДНК является одним из фундаментальных факторов для многих внутриклеточных процессов.

Так, например, лиганды с пониженной специфичностью к последовательности часто обладают способностью к регуляции экспрессии генов, трансляции и транскрипции [116-118]. Из-за сложной структуры двойной спирали ДНК возможны различные способы нековалентного связывания лигандов с ДНК: интеркаляция [1,8,39], бис - интеркаляция [69-71], связывание в малой бороздке [22,23,28-30], связывание в большой бороздке [8], их комбинация [9], а также связывание посредством неклассических механизмов (см [8]).

Для анализа эффекта флуктуаций при переходе спираль-клубок комплексов дц-ДНК с лигандами, связывающимися двумя способами с нативной и денатурированной ДНК нами изучено влияние лигандов на поведение корреляционной длины и степени денатурации ДНК.

Для этого была использована стандартная модель плавления комплексов ДНК – лиганд [118], принимая, что молекула ДНК состоит из N пар оснований. В области перехода спираль – клубок каждая пара оснований может находиться в одном из двух состояний: спиральном или клубкообразном. Опять же, предполагается, что молекула разбивается на n участков, содержащих N_1 клубкообразных пар оснований и N_2 спиральных пар оснований. Общее число пар оснований остается постоянным в процессе плавления и определяется по (2.1). Раствор также 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 инициации 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 [118,132-134]:

$$F = F_1 N_1 + F_2 N_2 + n_0 + \sum_{i=1,2} \sum_{\alpha=';''} k_i^\alpha \Psi_i^\alpha - T \ln W \quad (2.18)$$

Используя метод наиболее вероятного распределения, была получена система

уравнений (2.19) для концентраций $i^\alpha = \frac{k_i^\alpha}{N_i}$:

$$\frac{c_1' r_1' / 2}{1 - c_1' r_1' / 2} = \frac{PK_1'}{2} \left[\frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right] \quad (2.19)$$

$$\frac{c_1'' r_1'' / 2}{1 - c_1'' r_1'' / 2} = \frac{PK_1''}{2} \left[\frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right]$$

$$\frac{c_2' r_2'}{1 - c_2' r_2'} = \frac{PK_2'}{2} \left[\frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right]$$

$$\frac{c_2'' r_2''}{1 - c_2'' r_2''} = \frac{PK_2''}{2} \left[\frac{2D}{P} - 2(1 - \vartheta) c_1' - 2(1 - \vartheta) c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2'' \right]$$

где K_i^α - константы связывания, D - полная концентрация лигандов, r_i^α - число центров связывания одного лиганда, P - общая концентрация фосфатных групп и ϑ - степень спиральности. Уравнение для эффективного параметра роста спирали имеет вид:

$$S^* = S \frac{\left(1 - c_1' r_1' / 2\right)^{\frac{2}{r_1'}} \left(1 - c_1'' r_1'' / 2\right)^{\frac{2}{r_1''}}}{\left(1 - c_2' r_2'\right)^{\frac{1}{r_2'}} \left(1 - c_2'' r_2''\right)^{\frac{1}{r_2''}}}, \quad (2.20)$$

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. Фактически, модель со свободной энергией (2.18) сводится к модели чистой ДНК с переопределенным параметром роста спирали (2.20), зависящим от концентраций лигандов и параметров связывания лигандов с ДНК.

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

$$\mathcal{S} = \frac{1}{N} \langle N_2 \rangle, \quad (2.21)$$

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 (2.18), разработанная для описания перехода спираль – клубок в полипептидах и ДНК [125-129], которая более пригодна для описания флуктуационных эффектов, нежели (2.18). Энергия модели может быть представлена как:

$$H \{ \gamma \} = U \sum_{i=1}^N \delta_i^{(\Lambda)} \quad (2.22)$$

где N – число повторяющихся единиц, U – энергия стабилизации пары оснований, $\delta_j^{(\Lambda)} = \prod_{k=0}^{\Lambda-1} \delta(\gamma_{i=1,k}; 1)$, $\delta(x,1)$ – 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, параметры моделей (2.18) и (2.22) связаны между собой соотношениями:

$$U(\{c\}, \{r\}) = -RT \ln S^* + RT \ln(Q - 1) \quad (2.23)$$

и

$$\exp\left(-\frac{F_0}{RT}\right) = Q^{1-\Delta} \quad (2.24)$$

Здесь S^* - параметр роста спирали (2.20). Таким образом, энергия стабилизации пары оснований U становится концентрационно-зависимой. 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:

$$g_2(r) = \langle \delta_j^{(\Delta)} \delta_{j+r}^{(\Delta)} \rangle - \langle \delta_j^{(\Delta)} \rangle \langle \delta_{j+r}^{(\Delta)} \rangle, \quad (2.25)$$

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 как показано в [125]:

$$g_2(r) \propto \exp\left(-\frac{r}{\xi}\right), \quad (2.26)$$

где ξ – корреляционная длина. Как было показано в указанной работе, корреляционная длина одномерной системы удовлетворяет соотношению

$$\text{cth}\left(\frac{1}{2\xi}\right) = \frac{\partial \mathcal{G}}{\partial \ln S} \quad (2.27)$$

При этом, максимальное значение корреляционной длины достигается при температуре плавления (в точке полуперехода, $\mathcal{G} = 1/2$) и оценивается как [125]:

$$\xi_0 \approx \frac{1}{2} Q^{\frac{\Delta-1}{2}} \quad (2.28)$$

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.

Для учета влияния лигандов, описанных выше, степень спиральности и корреляционная длина были рассчитаны на основании уравнений (2.19-2.21). В настоящей работе мы сосредоточились на влиянии лигандов, имеющих большее сродство к нативной ДНК, нежели к расплавленной. Решение системы уравнений (2.19) было получено численно.

Если полная концентрация лигандов в растворе сопоставима с концентрацией фосфатных групп, $\frac{2D}{P} \sim 1$ и $PK'_1 \gg 1, PK'_2 \gg 1, PK''_2 \gg 1$, то комплексы ДНК – лиганд демонстрируют как высоко- так и низкотемпературную денатурацию в сочетании с широким “окном” стабильности двойной спирали ДНК, совпадающим с областью перехода спираль – клубок чистой ДНК [130]. В этом случае ключевым моментом является более высокое сродство лигандов к нативной ДНК, чем к денатурированной. При этом, высокотемпературная денатурация комплексов ДНК – лиганд существенно сдвигается в область высоких температур, по сравнению с чистой ДНК. В то же время, при температурах, когда чистая ДНК остается денатурированной, комплексы ДНК – лиганд находятся в нативном состоянии. При понижении температуры, комплекс ДНК – лиганд претерпевает «холодовую» денатурацию, в то время как чистая ДНК становится спиральной [130]. Явление “холодовой” денатурации наблюдалось экспериментально для белков и нуклеиновых кислот [128-134]. Механизм данного явления рассматривался в большом количестве публикаций [128-134]. «Холодовая» денатурация комплексов ДНК – лиганд сопровождается перераспределением лигандов, связанных с расплавленными областями ДНК [130]. В то время, как концентрация лигандов, связанных с нативными областями c_2^α остается постоянной при тепловой и холодной денатурации, концентрация лигандов,

связанных с расплавленными участками резко понижается в области холодной денатурации.

Таким образом, стабилизация расплавленной фазы происходит из-за лигандов, связывающихся с денатурированной ДНК.

Корреляционная длина была рассчитана на основании уравнений (2.19-2.21, 2.26). Как видно на рис. 18, температурная зависимость корреляционной длины комплекса ДНК – лиганд характеризуется двумя пиками, соответствующими холодной и тепловой денатурации. Высокотемпературный пик при этом сдвинут в сторону высоких температур, по сравнению с чистой ДНК. Как следует из соотношений (2.23 и 2.27), кооперативность перехода определяется максимальным значением корреляционной длины и является практически одинаковой как для чистой ДНК, так и для комплексов ДНК–лиганд в областях холодной и тепловой денатурации. При этом, температурный интервал тепловой денатурации не отличается от такового для тепловой денатурации чистой ДНК и комплексов ДНК – лиганд. В то же время, интервал перехода для холодной денатурации комплексов ДНК–лиганд является существенно более узким. Таким образом, можно утверждать, что интервал перехода не является однозначным показателем кооперативности перехода порядок – беспорядок.

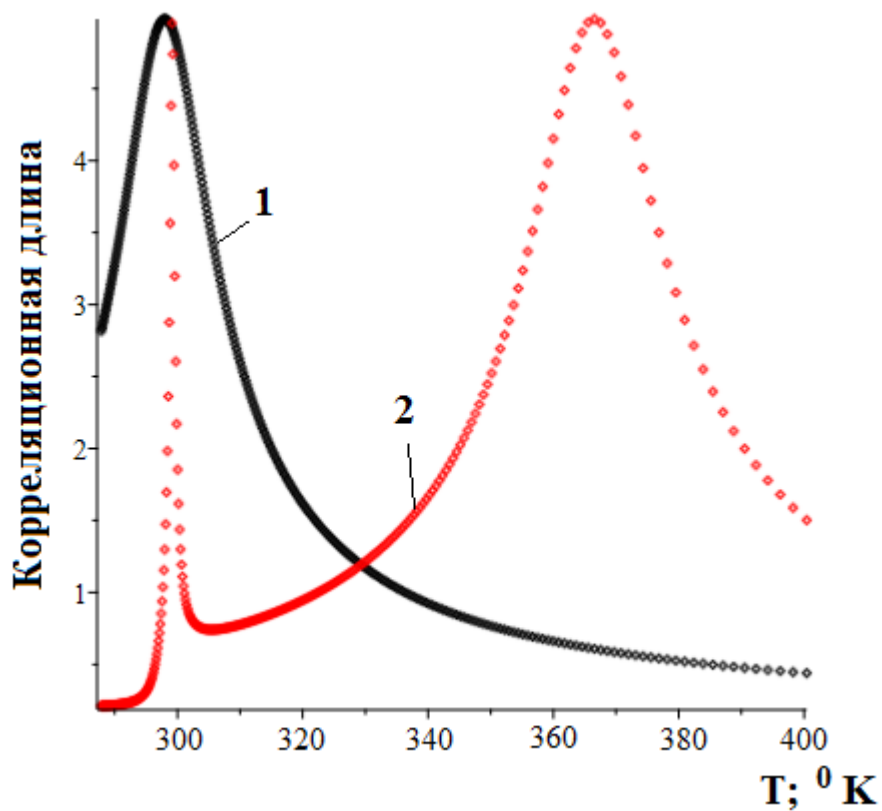


Рис. 18. Зависимость корреляционной длины от температуры. Кривая 1 – температурная зависимость степени денатурации чистой ДНК. Кривая 2 – температурная зависимость степени денатурации для параметров связывания: $r'_1 = 2$, $r''_1 = 2$, $r'_2 = 4$, $r''_2 = 4$, $K'_1 = 2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K''_1 = 10^2 \text{ M}^{-1}$, $K'_2 = 9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $K''_2 = 10^7 \text{ M}^{-1}$.

ГЛАВА 3

ЭНЕРГЕТИКА КООПЕРАТИВНЫХ ПЕРЕХОДОВ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ЛИГАНДАМИ

3.1. ЭНЕРГЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С ИНТЕРКАЛЯТОРАМИ БРОМИСТЫМ ЭТИДИЕМ И МЕТИЛЕНОВЫМ СИНИМ

Как уже отмечалось, несмотря на высокую биологическую активность, широкое применение ДНК-интеркаляторов в качестве противоопухолевых и антибактериальных агентов ограничивается их высокой токсичностью [135,136]. Важность исследований по взаимодействию интеркаляторов с ДНК состоит в том, что они могут быть получены и с пищей, или синтезироваться клетками организма. Взаимодействуя с ДНК, эти вещества могут проявлять ингибирующую активность по отношению к лекарственным препаратам, природным и синтетическим мутагенам [136,137]. С другой стороны, применение таких активных соединений может снизить токсичность ароматических лигандов при клиническом применении. Основными молекулярными механизмами изменения токсичности при совместном применении различных веществ являются гетероассоциация лигандов (интерцепторный механизм) и конкуренция за места связывания с ДНК (протекторный механизм) [138-141].

Среди многочисленных ароматических соединений, непосредственно связывающихся с ДНК, БЭ относится к классическим интеркаляторам (рис. 19). В ряде исследований показано, что этот лиганд, в зависимости от концентрации и условий среды, взаимодействует с ДНК несколькими способами, а величина константы связывания изменяется в интервале $10^4 \div 10^7 \text{ M}^{-1}$ [142,143]. Многочисленные работы, относящиеся к отдельному или совместному с другими лигандами связыванию БЭ с ДНК во многом обусловлены тем, что этот лиганд является удобной меткой (зондом) для модельных исследований [144-149].

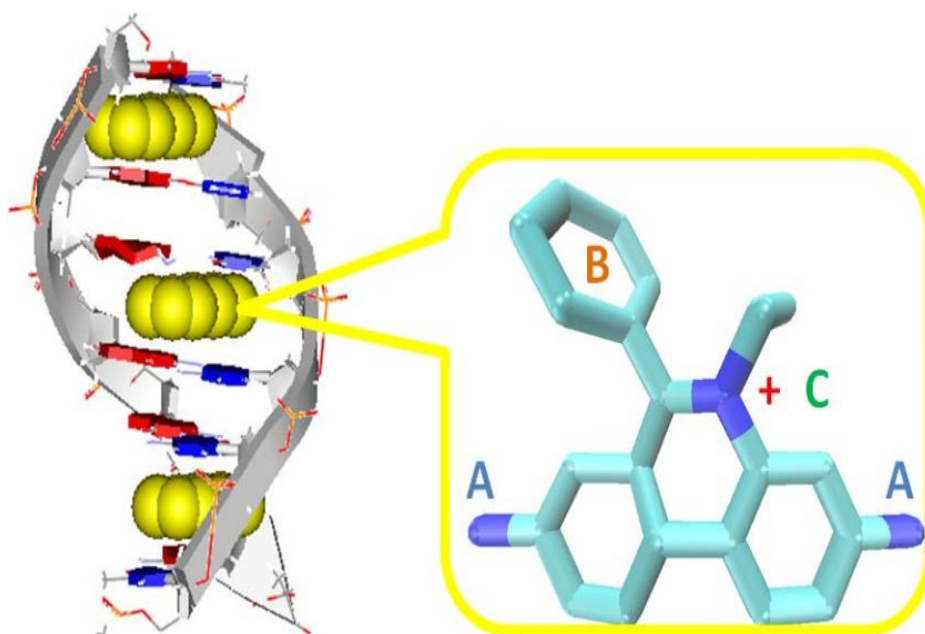


Рис. 19. Схема интеркаляции БЭ в ДНК по принципу исключенных мест связывания: А – аминогруппы лиганда, В-фенильная группа БЭ, С – положительный заряд, ответственный за растворимость лиганда и за электростатическое связывание с фосфатными группами ДНК или РНК [150].

С точки зрения биологической активности БЭ проявляет некоторые антибактериальные свойства и считается сильным мутагеном [151-153]. На этом основании, экспериментальные данные, полученные для комплексов БЭ с ДНК, а также разработанная теория могут служить базисом для исследования особенностей взаимодействия различных биологически активных веществ с ней. С другой стороны, выявление соответствий или несоответствий теоретических и экспериментальных данных по взаимодействию БЭ с ДНК также важно для понимания механизмов связывания малых молекул с ДНК.

Для экспериментального обоснования теоретических данных необходимым является применение таких методов исследования, которые будут информативными настолько, чтобы полученные данные были точными и позволили описать эти результаты в рамках предложенных моделей. Среди них не потерял свою актуальность метод спектроскопического плавления (УФ плавление). Несмотря на относительную простоту, этот метод дает возможность качественно и количественно изучать комплексы ДНК-лиганд и на их основе оценить энергетические аспекты взаимодействия.

Природная ДНК при нейтральных рН и комнатной температуре представляет собой жесткоцепный полианион с достаточно консервативной вторичной структурой [2,3,5]. Вариация температуры или рН среды может привести к существенному изменению зарядовых и конформационных свойств макромолекулы. При этом, существует область рН, границы которой зависят от ионной силы раствора, в которой ДНК приобретает полиамфолитные свойства при сохранении двуспиральной структуры [154-158]. С другой стороны, в области щелочных рН наблюдается увеличение плотности и без того значительного отрицательного заряда макромолекулы. При щелочной или кислотной денатурации ДНК, которая наблюдается при более значительном изменении рН раствора, происходит катастрофическое падение ее жесткости. Этот процесс сопровождается уменьшением гидрофильности ДНК, так как обычно расположенные внутри двойной спирали гидрофобные азотистые

основания вступают в контакт с молекулами воды вследствие нарушения водородных связей, обеспечивающих стабильность вторичной структуры макромолекулы [154-158]. Сказанное выше свидетельствует о том, что молекула ДНК представляет собой уникальный объект, зарядовые свойства, жесткость, гидрофильность которой можно достаточно легко варьировать при изменении ионной силы, кислотности и состава растворителя. Таким образом, изучая взаимодействие молекулы ДНК с лигандами при вариации ионной силы, температуры, рН раствора, состава растворителя, можно получить дополнительную информацию о структуре и свойствах образующихся комплексов.

Методом УФ-плавления изучены также особенности одновременного взаимодействия ряда биологически активных соединений с ДНК. Изучение конкуренции за место связывания в таких системах дает информацию об участии тех или иных групп макромолекулы в образовании комплекса и характере взаимодействия компонентов.

3.1.1. Денатурация комплексов БЭ-ДНК: Влияние ионной силы и рН раствора

В физиологических условиях (нейтральный рН, умеренная ионная сила, комнатная температура) ДНК находится в основном в дц-состоянии. При повышении температуры до $\sim 80\div 90$ °С, при постоянстве остальных факторов, происходит расхождение нитей ДНК и она переходит в оц-состояние (см. [3]). В области перехода ДНК разбивается на двунитевые и однопитевые участки (рис. 21) [159-161]. Одноцепочечная ДНК, по сравнению с двухцепочечной, представляет собой существенно гибкую структуру (см. [4]), вследствие чего она в оц-состоянии поддается статистическому клубку. Процесс перехода спираль-клубок обратимый и при обращении внешних факторов к первоначальным значениям, дц-структура восстанавливается.



Рис. 20. Плавление ДНК. В области перехода ДНК разбивается на чередующиеся двунитевые и однонитевые участки [159].

Плавление ДНК рассматривается с точки зрения перехода одномерного кристалла в расплавленное состояние, при котором истинный фазовый переход отсутствует, при этом, этот переход происходит на ненулевом интервале изменения фактора, вызывающего этот переход (см. [161]). Исходя из этого, плавление ДНК характеризуется двумя параметрами – температурой плавления T_m и шириной интервала плавления ΔT . Температурой плавления считается точка, соответствующая 50%-ой денатурации ДНК. Ширина интервала перехода определяется как разность температур, при которых касательная к кривой плавления в точке, соответствующей T_m , пересекает оси, когда плавление еще не началось и, когда оно полностью произошло. На величину T_m влияют ряд факторов – ионная сила раствора, типы катионов, среднее ГЦ содержание ДНК, а также различные соединения, связывающиеся с ДНК [5,161]. Зависимость стабильности ДНК к температуре можно представить с помощью уравнения:

$$T_m = T_{AT} + \bar{X}(T_{GC} - T_{AT}) \quad (3.1)$$

где T_{GC} и T_{AT} – температуры плавления GC и AT последовательностей, \bar{X} – среднее ГЦ содержание [161]. При нейтральных pH и изменении концентрации ионов одновалентных металлов (Li^+ , Na^+ , K^+ и др.), можно определить T_m с помощью более общей, полученной эмпирическим способом формулы [161]:

$$T_m = 176 - (2,6 - \bar{X})(36 - 7,04 \lg[Na^+]) \quad (3.2)$$

Ширина интервала плавления ΔT не находится в корреляции с T_m и обычно колеблется в интервале от 3 до 15 градусов. При этом, ΔT мало зависит от ионной силы раствора, однако различные химические соединения могут значительно изменить этот параметр (см. [160]). В частности, как уже отмечалось выше (см. Главу 2), некоторые лиганды, БЭ, АМД, профлавин и др., связываясь с ДНК, стабилизируют ее нативную структуру в определенном интервале изменения $r = [\text{лиганд}]/[\text{ДНК}]$ (D/P) - $0 < r \leq 0,5$, вследствие чего T_m комплексов ДНК с этими лигандами возрастает. Более того, увеличивается

также ΔT . Как показывает разработанная выше теоретическая модель, кривая зависимости изменения T_m от r возрастает линейно, при этом, при низких значениях r эта кривая имеет бо́льшую крутизну, чем при относительно больших значениях r (рис. 16). В этих условиях кривая зависимости изменения ΔT от r приобретает колоколообразную форму в случае мультимодальных лигандов (рис. 17). Одной из заключений разработанной теории является то, что при определенных значениях r (при больших концентрациях мультимодального лиганда) кривая зависимости изменения T_m начинает убывать, а кривая зависимости изменения ΔT , приближаясь к нулевому значению, возрастает (рис. 16). Более того, эти лиганды, являясь стабилизаторами дц-структуры ДНК, начинают предпочтительнее связываться с ее оц-участками, превращаясь в дестабилизатора дц-структуры.

Эти выводы предложенной теории для мультимодального лиганда были обоснованы экспериментально. В частности, проведенные исследования по плавлению ДНК и ее комплексов с БЭ в интервале изменения ионной силы $0,002 \leq I \leq 0,02$ М подтверждают, что кривые плавления комплексов смещены в сторону высоких температур по отношению к кривой плавления ДНК, по мере увеличения концентрации БЭ в растворе (рис. 21) [163]. Примечательно, что при относительно высоких концентрациях БЭ кривые плавления комплексов проявляют тенденцию к смещению в сторону низких температур по отношению к предыдущему.

На рис. 22 приведены зависимости $\delta(1/T_m)$ от r при ионных силах 0,002; 0,01 и 0,02 М, рассчитанные из значений T_m (определенные из кривых плавления) в соответствии с разработанной теорией для мультимодального лиганда (кривые плавления, полученные при ионной силе раствора 0,01 М претерпевают аналогичные изменения и не приводятся). Из рис. 22 очевидно, что $\delta(1/T_m)$ от r линейно возрастает в интервале изменения $0 < r \leq 0,33$, однако при более высоких концентрациях БЭ эта зависимость

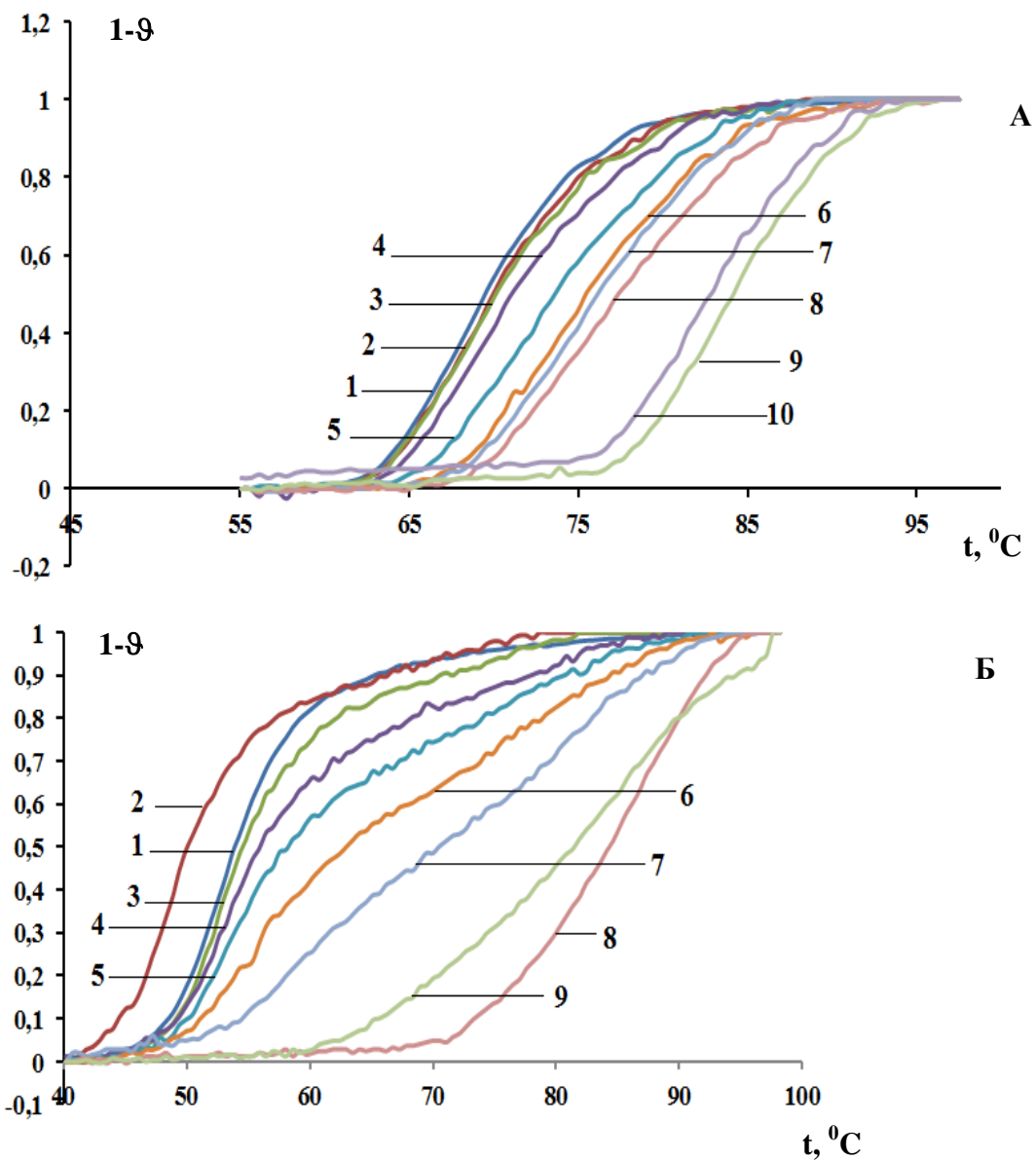


Рис. 21. Кривые плавления ДНК (кривые 1) и ее комплексов с БЭ (кривые 2-10) (А) и (2-9) (Б), при возрастающей концентрации лиганда. Концентрация ДНК составляла $\sim 6 \cdot 10^{-5}$ М/л. Концентрационное соотношение $[БЭ]/[ДНК]$ варьировалось в интервале $0,01 \leq [БЭ]/[ДНК] \leq 0,5$, при $pH \approx 7,0$.

А - ионная сила раствора 0,02 М, Б - ионная сила раствора 0,002 М.

выходит на плато с последующей тенденцией понижения. Необходимо отметить, что при низких ионных силах раствора эти кривые имеют бо'льшую кривизну, что указывает на то, что стабилизирующее влияние катионного лиганда БЭ на дц-структуру ДНК более выражено (см. Главу 1). Таким образом, экспериментальные результаты с одной стороны находятся в хорошем соответствии с литературными данными, и с другой стороны – с теоретическими выводами.

На рис. 23 приведены зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r , также рассчитанные из экспериментальных значений ΔT ДНК и ее комплексов с БЭ (значения ΔT определены из кривых плавления). Из приведенного рисунка также очевидно хорошее соответствие между теорией и экспериментом. Кривая зависимости изменения $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r колоколообразная, поскольку возрастает при низких концентрациях БЭ (в интервале $0 < r \leq 0,2$), затем пройдя через небольшой максимум, уменьшается, достигая нулевого значения. Более того, при достаточно больших концентрациях БЭ (при соотношении БЭ/ДНК=1/2 п.о.) $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r опять увеличивается. Как предсказывалось указанной теорией, при низких концентрациях БЭ связывается с ДНК как скрепка, поскольку стабилизирует дц-структуру последней. При этом, комплексы ДНК-БЭ не только становятся термостабильнее по сравнению с ДНК, но и имеет место предпочтительное связывание молекул лиганда с дц-структурами последней, поскольку в ходе плавления происходит их перераспределение с расплавленных одноцепочечных участков на еще нерасплавленные дц-участки. Вследствие этого интервал плавления уширяется. Сравнение теоретически рассчитанных количественных значений r ($r=D/P$ на п.о.) выявляют высокое совпадение, что очевидно из данных рис. 17 и 23. Эти данные указывают на то, что предпочтительное взаимодействие БЭ с дц-участками ДНК соответствует связыванию одной молекулы лиганда с примерно 5-ю п.о. Это соответствует

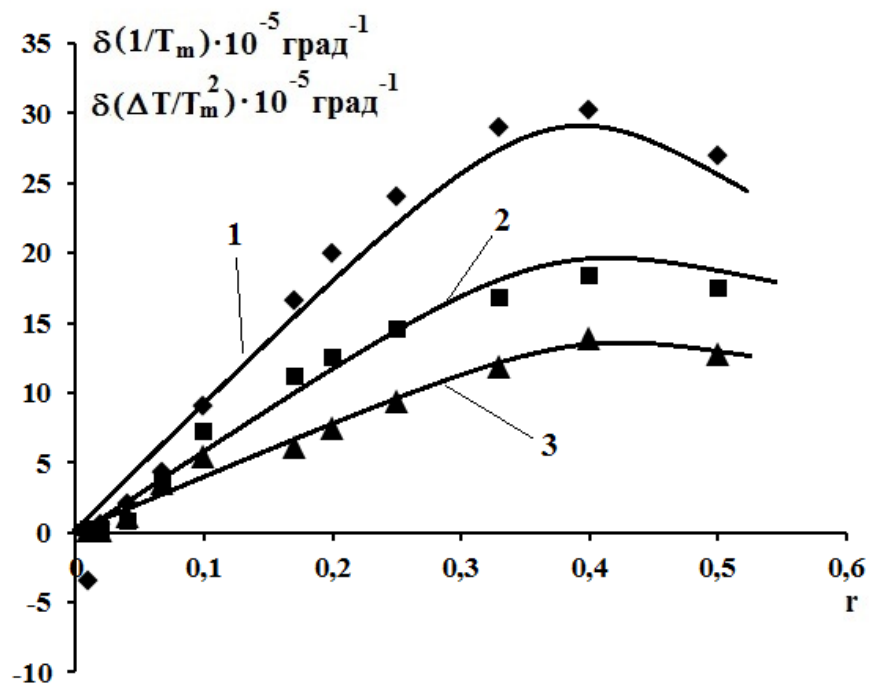


Рис. 22. Кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ от r комплексов БЭ-ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,01 (2) и 0,02 М (3), рН=7.0.

интеркаляционному способу связывания БЭ. При дальнейшем увеличении концентрации лиганда дц-участки ДНК становятся недоступными для интеркаляции молекул БЭ, однако для других способов места связывания доступны, и проявление этих способов приводит к образованию максимума на кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r , которая при больших концентрациях БЭ начинает уменьшаться. В случае существования только одного способа кривая зависимости изменения $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r должна была выходить на плато. Так как и' экспериментально, и' теоретически получается колоколообразная зависимость, разумно полагать, что БЭ может связываться более чем одним способом с ДНК. Как и другие катионные лиганды, БЭ может взаимодействовать с ДНК электростатически. Более того, моноинтеркаляция происходит в два этапа: молекулы лиганда из водной среды переходят в связанное состояние с наружной стороны ДНК преимущественно электростатическим способом, затем имеет место полная интеркаляция этих молекул [42-44,164,165]. Тем самым, наряду с интеркаляцией, БЭ связывается с ДНК электростатически. Однако, анализ кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r , с позиции существования двух способов связывания, не дает полного объяснения колоколообразной формы этой кривой, 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 тот факт, что параметр ΔT является мерой гетерогенности энергии стекинг взаимодействий между АТ-АТ, АТ-ГЦ и ГЦ-ГЦ парами [4,161]. Уменьшение ΔT указывает на то, что степень гетерогенности между этими парами понижена. Такое уменьшение гетерогенности может иметь место в том случае, если БЭ, кроме интеркаляции и электростатического способа, связан с ДНК по крайней мере еще одним способом. Более того, наряду с дц-участками, этот лиганд должен связываться и с ее оц-участками, способствуя расплавлению

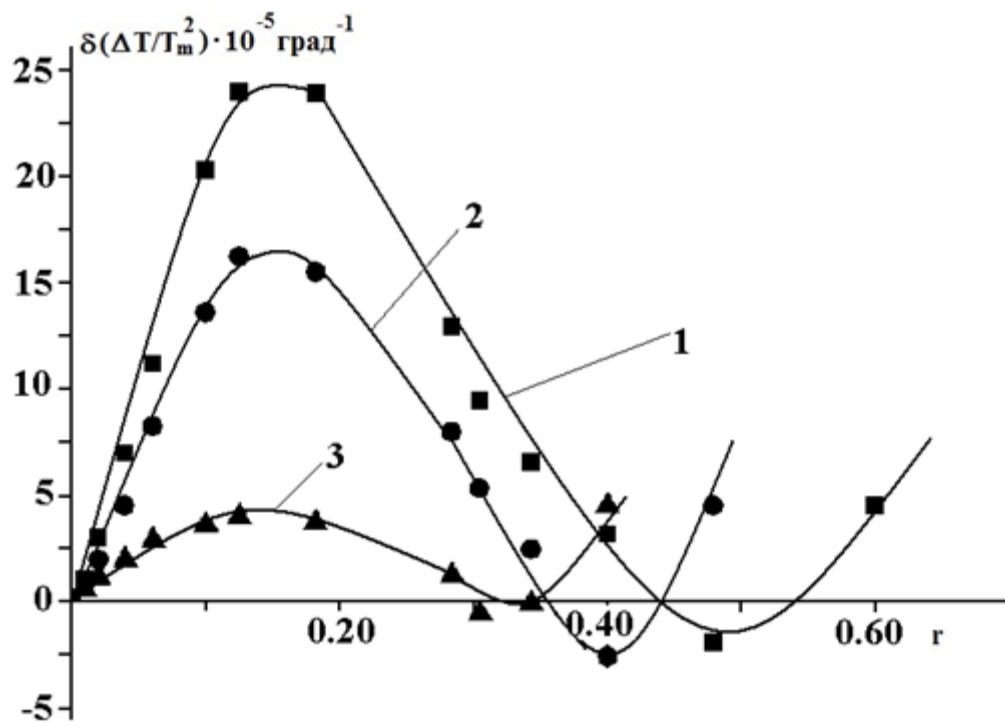


Рис. 23. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r комплексов БЭ-ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,01 (2) и 0,02 М (3), рН=7.0.

ДНК. Этот факт отражается на T_m и ΔT : в интервале $0,33 < r \leq 0,5$ T_m и в интервале $0,2 < r \leq 0,5$ ΔT уменьшаются, что указывает на то, что молекулы БЭ в определенном интервале изменения r связываются и с оц-участками, при этом, по мере увеличения концентрации этого лиганда, связывание с одноцепочечными участками ДНК становится предпочтительнее, результатом чего является уширение ΔT при концентрациях, когда места связывания на дц-участках насыщены, в то время как на оц-участках практически не заполнены.

Эти экспериментальные результаты полностью подтверждают существование мультимодальных лигандов. Примечательно, что мультимодальность БЭ не зависит от ионной силы раствора, однако влияние того или иного способа связывания на стабильность дц- или оц- структуры зависит от этого фактора. С другой стороны, существенно большее изменение $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r при низких ионных силах раствора указывает на то, что этот фактор может влиять на термодинамические характеристики различных способов связывания БЭ с ДНК. Эти заключения обосновываются также экспериментальными исследованиями кислотной денатурации ДНК и ее комплексов с БЭ в интервале изменения $0 \leq r \leq 1$ (мольное соотношение), результаты которых выявили, что БЭ с ДНК связывается несколькими способами и при кислых рН.

Необходимо отметить, что при щелочных значениях рН меняется ионная сила раствора в ходе титрования, так как каждый раз в раствор вводятся ионы Na^+ , а это приводит к смещению точки перехода, которая зависит от ионной силы раствора. Увеличение концентрации H^+ также влияет на точку перехода, однако в данном случае, особенно в интервале $4,0 \leq pH \leq 8,0$, это влияние несущественно [4,164].

Кривые перехода спираль-клубок ДНК (1) и ее комплексов с БЭ (2-11) под влиянием кислых рН приведены на рис. 24 в указанном выше интервале изменения r . По мере увеличения концентрации БЭ, pH_m (точка перехода), сдвигается в сторону более низких значений рН, а также имеет место уширение

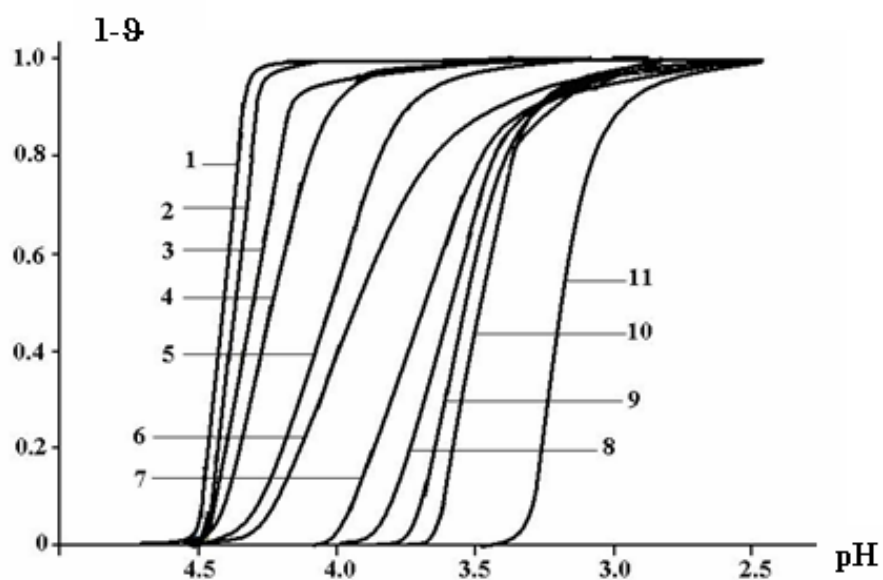


Рис. 24. Кривые перехода спираль-клубок чистой ДНК (1) и ее комплексов с БЭ (2-11) в интервале изменения $2.5 \leq \text{pH} \leq 7.0$, при концентрации Na^+ - $2.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $t=25^\circ\text{C}$, при значениях r : 1 - 0; 2 - 0.01, 3 - 0.013; 4 - 0.02; 5 - 0.025; 6 - 0.04; 7 - 0.067; 8 - 0.10; 9 - 0.20; 10 - 0.33; 11 - 1.0.

интервала концентрации $[H^+]$, в пределах которых комплексы переходят в полностью денатурированное состояние. Из кривых денатурации получены значения pH_m и ΔpH по аналогии с термоиндуцированным переходом. На основании этих величин получены зависимости δpH_m (1) и $\delta \Delta pH$ (2) от r , приведенные на рис. 25. Очевидно, что и под влиянием кислого pH зависимость $\delta \Delta pH$ от r , как и в случае термоиндуцированного перехода, имеет колоколообразную форму, что подтверждает вывод о том, что мультимодальность БЭ при взаимодействии с ДНК практически не зависит от условий растворителя и проявляется также под влиянием pH .

Необходимо отметить, что кислый pH является как физическим, так и химическим фактором, поскольку ионы водорода начинают взаимодействовать с функциональными группами и ДНК, и БЭ. Так, при кислых pH ($2,5 \leq pH < 6$) аминогруппы БЭ находятся в протонированном состоянии, при этом несвязанные молекулы лиганда протонированы при $pH \approx 2.5$, а связанные с ДНК молекулы - ≈ 5.5 (см. [166]). Необходимо также отметить, что при $pH \geq 3$ в составе нуклеозидов и нуклеотидов протонируются в основном эндоциклические атомы N_1 аденина и N_3 цитозина, которые участвуют в образовании водородных связей в двухцепочечной ДНК [4]. Следовательно, мы полагаем, что эти группы в дц-ДНК не могут протонироваться при значениях $pH \geq 3.5$. Так как полученные экспериментальные результаты практически совпадают с таковыми, полученными при термоиндуцированном переходе можно утверждать, что при кислых pH способы связывания БЭ с ДНК не меняются. Следовательно, при низких концентрациях лиганда увеличение $\delta \Delta pH$ обусловлено стабилизирующим влиянием БЭ на дц-структуру ДНК, т.е. в этих условиях молекулы БЭ интеркалируют в дц-ДНК. При увеличении концентрации БЭ $\delta \Delta pH$ проходит через слабо выраженный максимум ($0,05 \leq r_b \leq 0,1$). По сравнению с термоиндуцированным переходом, в этом случае максимум проявляется при более низких концентрациях БЭ (см. [163]).

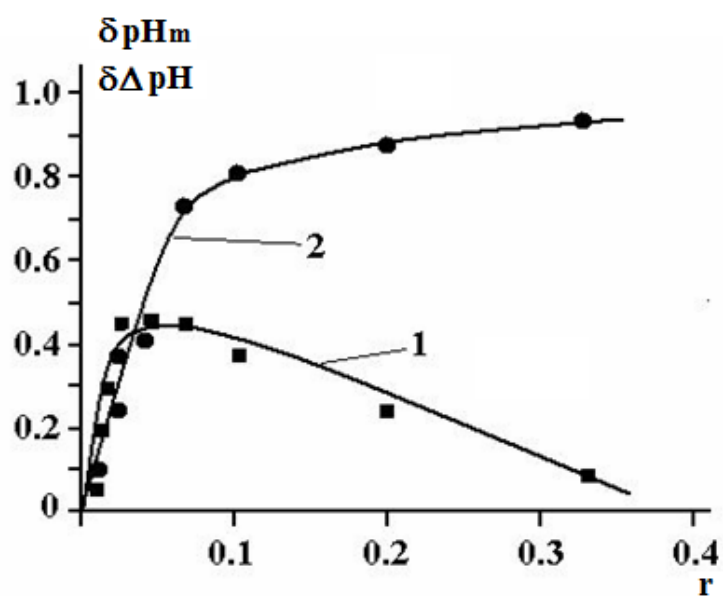


Рис. 25. Кривые зависимости $\delta\Delta pH$ (1) и δpH_m (2) от r в интервале изменения $0 \leq r \leq 1$ при $t=25^\circ C$ $\mu=2 \cdot 10^{-2} M Na^+$. Кривые изменения δpH_m и $\delta\Delta pH$ получены из кривых, приведенных на рис. 1. Зависимость $\delta\Delta pH$ от r колоколообразная, как и в случае термоиндуцированного перехода.

Вероятно, что места для интеркаляции молекул БЭ в протонированном состоянии более ограничены, и после их насыщения БЭ начинает связываться с ДНК другими способами, как выше показано. С увеличением концентрации БЭ на дц-участках места связывания насыщаются, вследствие чего молекулы лиганда начинают связываться с оц-участками ДНК, дестабилизируя ее и облегчая переход, вследствие чего кривая зависимости $\delta\Delta pH$ от r начинает уменьшаться. На это указывает и тот факт, что изменение δpH_m резко возрастает в интервале $0.05 \leq r \leq 0.1$ и претерпевает небольшое изменение при $r > 0.1$. Эти данные являются веским доводом в пользу того, что мультимодальность БЭ при взаимодействии с ДНК не зависит от ионной силы, температуры или pH раствора, при этом, связывания БЭ с ДНК одинаковы как при протонированном, так и непротонированном состояниях лиганда.

3.2. Взаимодействие ДНК с неинтеркалятором Hoechst 33258

Выше приведенные данные позволяют утверждать, что существуют обратимо связывающиеся с ДНК соединения, которые с ней взаимодействуют несколькими способами (мультимодальные лиганды). Разработанная выше теория, относящаяся к мультимодальным лигандам, позволяет оценить особенности связывания таких веществ с ДНК и выявить число способов взаимодействия, а также предсказать некоторые аспекты молекулярного механизма взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами.

Данная теория является хорошим инструментом для скрининга биологически активных веществ и выделения из них мультимодальных лигандов. Теория была разработана для лигандов, которые могут связываться с ДНК различными механизмами. Выше были приведены данные по взаимодействию классического интеркалятора БЭ с ней. Здесь мы приводим результаты исследований по взаимодействию неинтеркалятора с ДНК и анализ

полученных данных на основании указанной теории. Нами в качестве неинтеркалятора было выбрано классическое желобково связывающееся соединение Hoechst 33258 (H33258). Взаимодействие H33258 и его производных с ДНК в последнее время широко исследуется, поскольку этот лиганд применяется в качестве флуоресцентного красителя хромосом, а также проявляет противоопухолевые свойства [167-175]. Этот лиганд предпочтительнее связывается с В формой ДНК, в ее малом желобке и проявляет высокую специфичность к АТ богатым участкам. Однако не все АТ пары являются центрами связывания, так как показано, что этот лиганд связывается с центральными (АТ)_n парами (n=4-6), которые с обеих сторон граничат с GC парами (см рис. 2 (a)) [13].

H33258 и его производные являются бис-бензимидазольными соединениями. Флуоресцентные исследования комплексов H33258 с ДНК тимуса теленка при различных соотношениях лиганд/ДНК показывают, что при низких концентрациях этот лиганд связывается в малом желобке ДНК, в то время как при больших концентрациях частично интеркалирует в GC последовательности [13,175-180]. Более того, учитывая, что природная ДНК обычно содержит большое количество повреждений и изломов, и не исключена возможность вклинивания H33258 в эти гибкие участки. H33258, связываясь с ДНК, блокирует репликацию ДНК в процессе деления клетки, следовательно, этот лиганд может применяться в качестве антибиотика или противоопухолевого препарата [176].

3.2.1. Плавление комплексов ДНК с Hoechst 33258: влияние ионной силы раствора

Плавление комплексов H33258 с ДНК тимуса теленка, как и в случае БЭ, проводилось при различных ионных силах раствора для выяснения особенностей молекулярных механизмов связывания этого лиганда с ДНК.

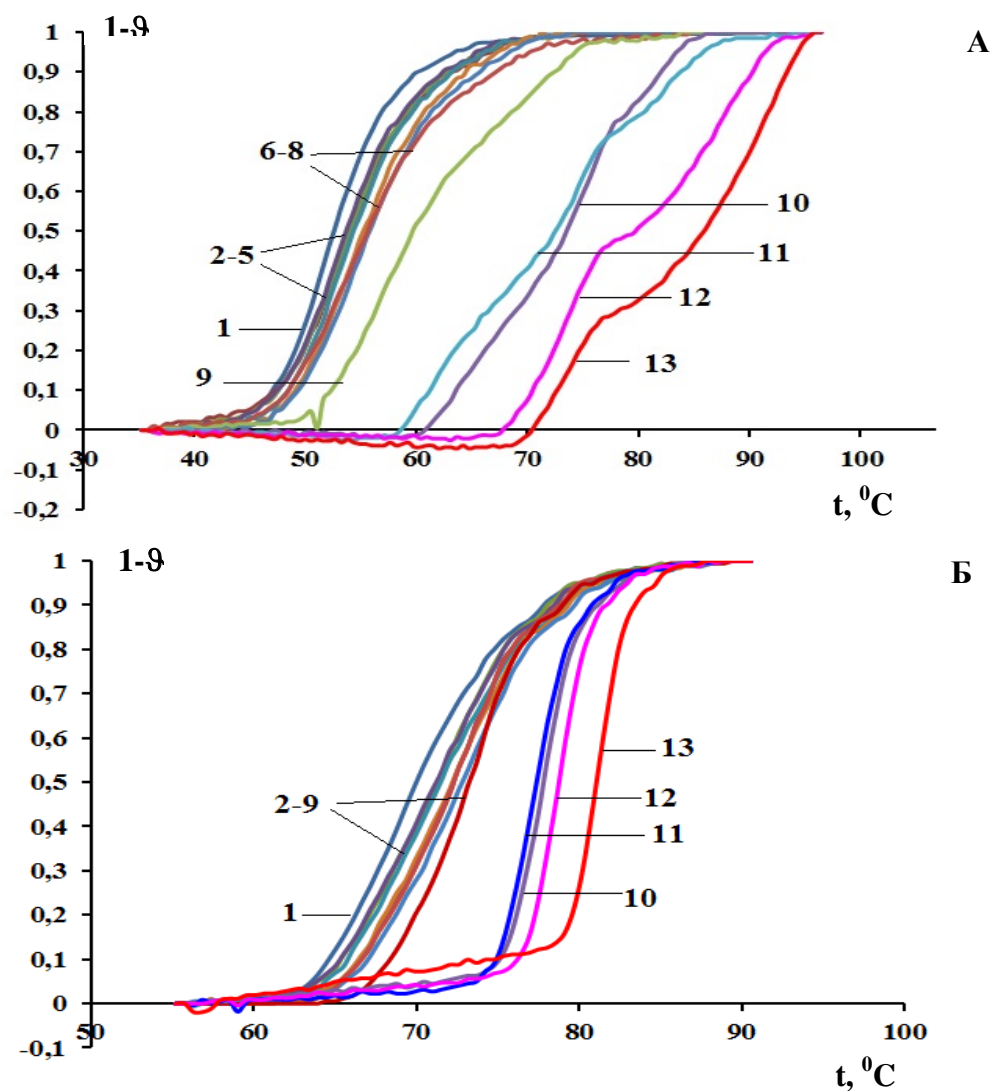


Рис. 26. Кривые плавления ДНК (кривые 1) и ее комплексов с Н33258 (кривые 2-13) при возрастающей концентрации лиганда. Концентрация ДНК составляла $\sim 6 \cdot 10^{-5}$ М/л. Концентрационное соотношение $r = [\text{H33258}] / [\text{ДНК}]$ варьировалось $0,01 \leq r \leq 0,33$, при $\text{pH} \approx 7,0$.

А. Ионная сила раствора 0,002 М, Б. Ионная сила раствора 0,02 М.

Необходимо также отметить, что комплексы Н33258 с ДНК в основном исследуются при фиксированной ионной силе, к тому же, большинство работ относятся к структурным особенностям образованных комплексов, минуя термодинамические основы их образования. Тем не менее, наряду со структурными, важным являются также термодинамические исследования, что позволит лучше понять особенности взаимодействия нековалентно связывающихся лигандов с ДНК.

Плавление комплексов Н33258 с ДНК проводилось при ионных силах раствора 0,002; 0,004; 0,01 и 0,02 М. На рис. 26 представлены кривые плавления комплексов Н33258 с ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 и 0,02 М (при 0,004 и 0,01 получены аналогичные кривые, которые не приведены). Из приведенного рисунка становится очевидным, что по мере возрастания γ имеет место сдвиг кривых комплексов в сторону высоких температур относительно кривой плавления ДНК. Это указывает на стабилизирующее дц-структуры ДНК влияние Н33258. Очевидно также, что кривые плавления при различных концентрационных соотношениях взаимодействующих молекул разнятся по крутизне. Примечательно, что при ионной силе раствора 0,002 М крутизна кривых плавления комплексов уменьшается, по мере возрастания концентрации Н33258.

Для выяснения числа способов связывания Н33258 с ДНК получены значения изменений температуры плавления и ширины интервала плавления комплексов по аналогии с приведенной выше моделью, разработанной для комплексов ДНК с БЭ, АМД. Кривые этих зависимостей от γ , полученные на основании кривых плавления, приведены на рис. 27 и 28 (на указанных рисунках представлены кривые, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,004 (2) и 0,02 М (3), кривые же, полученные при ионной силе 0,01 М по форме совпадают с кривой, полученной при $\mu=0,02$ М. Эти кривые не приведены). Из рис. 27 видно, что кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ от γ возрастают при низких концентрациях лиганда и проявляют тенденцию насыщения, по

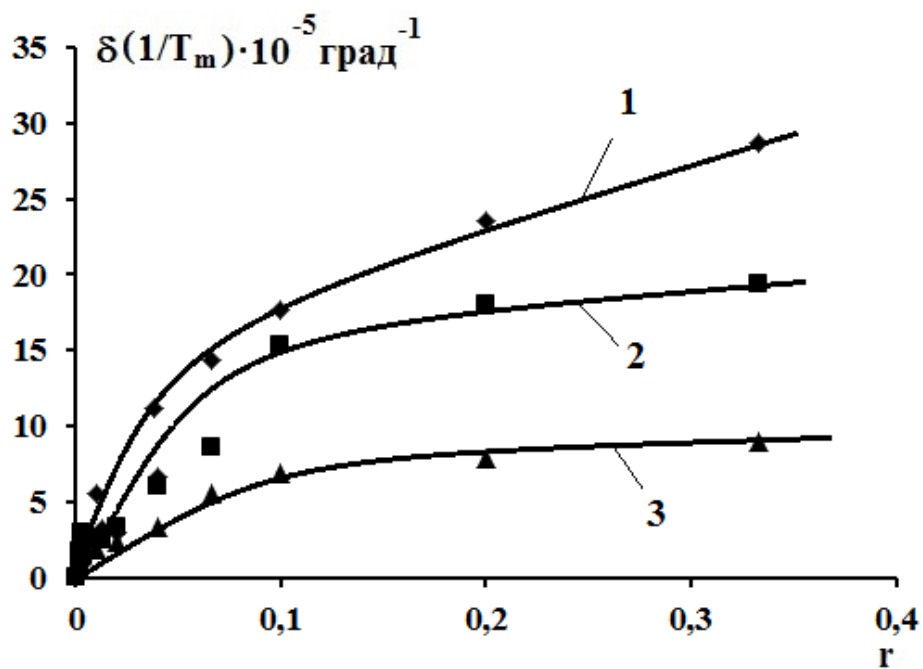


Рис. 27. Кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ от r комплексов H33258-ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,004 (2) и 0,02 М (3), рН=7.0.

мере возрастания концентрации Н33258. Однако при ионной силе раствора 0,002 М кривая зависимости $\delta(1/T_m)$ от r проявляет тенденцию к увеличению. Эти результаты указывают на то, что стабилизирующее влияние Н33258 на дц-ДНК (величина изменения T_m) зависит от ионной силы раствора. Эти кривые условно можно разбить на два участка, которые обусловлены двумя способами связывания. При этом, из рис. 27 становится очевидным, что наибольшее изменение имеет место при ионной силе 0,002 М. Этот факт может быть результатом существования двух способов связывания Н33258 с ДНК, один из которых имеет электростатическую природу. Другой способ, как показано выше, соответствует специфическому связыванию с АТ парами в малом желобке ДНК или интеркаляции в ГЦ богатые участки.

Полученные данные выявляют, что вклад электростатического составляющего при низких ионных силах раствора в общую стабилизацию нативной структуры ДНК существенен (этот лиганд также является катионом), чем при относительно больших ионных силах раствора.

Таким образом, из анализа этих результатов на основании литературных данных по взаимодействию Н33258 с ДНК, а также в рамках разработанной для мультимодального лиганда теории, мы заключаем, что Н33258 предпочтительнее связывается с нативной ДНК, при этом взаимодействует с ней двумя способами, один из которых более слабый, поскольку в ходе плавления часть связанных этим способом молекул лиганда диссоциирует, и этот способ соответствует электростатическому.

Более подробную 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. 28, кривые этой зависимости, полученные при ионных силах 0,002; 0,004 и 0,02 М радикально отличаются друг от друга (кривая, полученная при ионной силе 0,01 М по форме совпадает с кривой 3 рис. 28, поэтому не приводится). Из приведенного рисунка видно, что при ионной силе раствора 0,002 М,

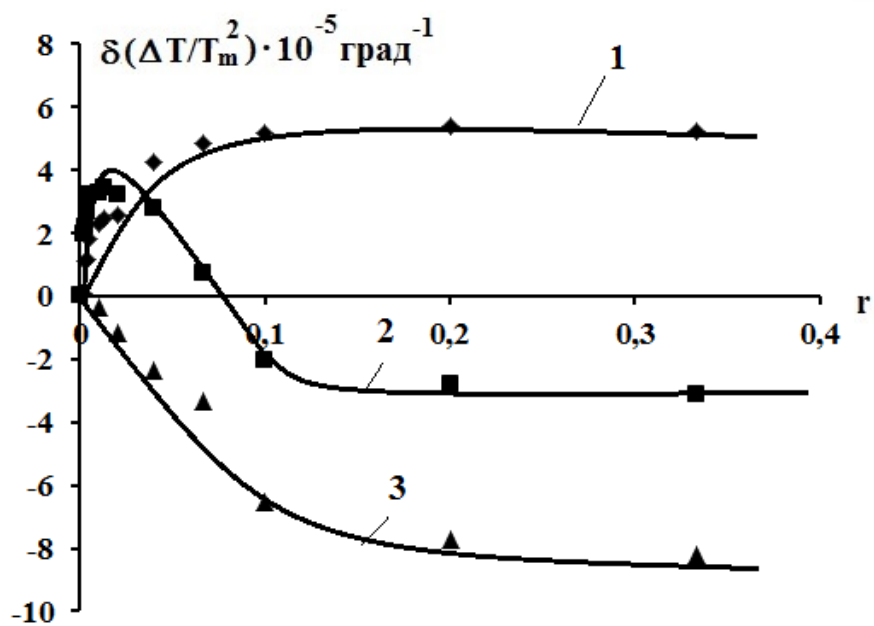


Рис. 28. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от γ комплексов НЗ3258-ДНК, полученные при ионных силах раствора 0,002 (1); 0,004 (2) и 0,02 М (3), рН=7.0.

кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r 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 локализуется в малом желобке ДНК и специфически связывается с АТ парами оснований ДНК. Это приводит к стабилизации этих пар, вследствие чего T_{AT} возрастает. Известно, что $\Delta T = T_{GC} - T_{AT}$, следовательно, при постоянном значении T_{GC} , если T_{AT} увеличивается, то ΔT уменьшится (см. [115]), вследствие чего и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r приобретает отрицательные значения.

С этой точки зрения ход кривой 1 (рис. 28) нельзя объяснить проявлением АТ специфичности со стороны Н33258. Литературные данные указывают на то, что пространственная структура Н33258 совпадает с геометрической формой малого желобка ДНК, при этом, в стабилизации комплексов важную роль играют электростатическое, ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия, а также водородные связи [181-185]. Более того, малый желобок проявляет эластичность и адаптируется к связыванию с лигандом. Необходимо отметить, что важное значение для комплексообразования Н33258 с ДНК имеет более высокая степень гидрофобности и высокая электроотрицательная плотность малого желобка ДНК [186-191].

Эти особенности малого желобка устанавливаются в физиологических условиях. С этой точки зрения, при низких ионных силах раствора структура ДНК становится более релаксированной и открытой (см [4]), вследствие чего геометрия малого желобка, степень гидрофобности и плотность электроотрицательного потенциала меняются. Следовательно, при низких ионных силах раствора АТ специфичность Н33258 исчезнет, что и обнаруживается экспериментально.

Полученные данные выявляют также одну важную особенность этого лиганда: Н33258 обладает мультимодальностью при взаимодействии с ДНК (см. [167]), однако это свойство проявляется при различных условиях среды, в то время как при постоянстве других условий раствора и 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. 28, кривая 2 имеет колоколообразную форму, поскольку возрастает при низких концентрациях лиганда, затем пройдя через слабо выраженный максимум, начинает уменьшаться и при определенных концентрациях лиганда ($r \geq 0,1$) принимает отрицательные значения.

При ионной силе раствора 0,004 М, при низких концентрациях Н33258 с ДНК связывается неспецифически, вследствие чего $\delta(\Delta T/T_m^2)$ увеличивается. Затем, начиная с определенных концентраций ($r \approx 0,04$) основным становится специфическое связывание с АТ последовательностями и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ начинает уменьшаться.

Сравнивая полученные нами экспериментальные данные с существующими литературными, мы заключаем, что при низких концентрациях неспецифическое связывание Н33258 с ДНК при ионных силах раствора 0,002 и 0,004 М соответствует интеркаляционному способу [167,192]. Увеличение ионной силы примерно в 5-10 раз вызывает радикальное изменение механизма связывания этого лиганда сильным способом, и основным становится АТ специфичность.

Сравнение данных по взаимодействию БЭ и Н33258 с ДНК выявляют следующее:

- колоколообразное изменение зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r в случае БЭ является результатом его связывания с дц- и оц-ДНК несколькими способами одновременно и не зависит от ионной силы раствора.

- аналогичное поведение этой зависимости проявляется и под влиянием кислых рН, что обусловлено универсальностью механизмов связывания этого лиганда с ДНК;
- колоколообразное изменение $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r в случае Н33258 проявляется при ионной силе раствора 0,004 М и является результатом двух различных механизмов связывания одновременно;
- при низких ионных силах раствора ($\mu \leq 0,002$ М) Н33258 с ДНК связывается интеркаляционным и электростатическим способами: при относительно больших ионных силах ($\mu > 0,004$ М) основными становятся АТ специфическое и электростатическое способы связывания Н33258 с ДНК.

3.3. Взаимодействие ДНК с неклассическим интеркалятором метиленовым синим

Исследования некоторых аспектов непосредственного связывания различных лигандов с ДНК представляют интерес для многих научных центров, изучающих взаимодействие низкомолекулярных веществ с ДНК [20,35, 193-195].

Сильное, а также специфическое связывание лекарственных препаратов с определенными последовательностями ДНК, которые, при этом, могут вызывать структурные повреждения в ней, может быть эффективным для предотвращения клеточного деления при опухолевых процессах [195,196].

Среди широко применяемых противоопухолевых веществ, важное значение имеют тиониновые соединения (схема 3). Тионин имеет гетероароматическую молекулу и является аналогом акридиновых соединений, принадлежит фенотиазиновым лекарствам. Это вещество применяется как полупроводник, сенсibilизатор энергии, проба для исследования различных сред, включающих мицеллы, полимерных матриц, при подготовке

функционирования наноматериалов или для высококвантовой эффективности фотоэлектрических клеток [197-202].

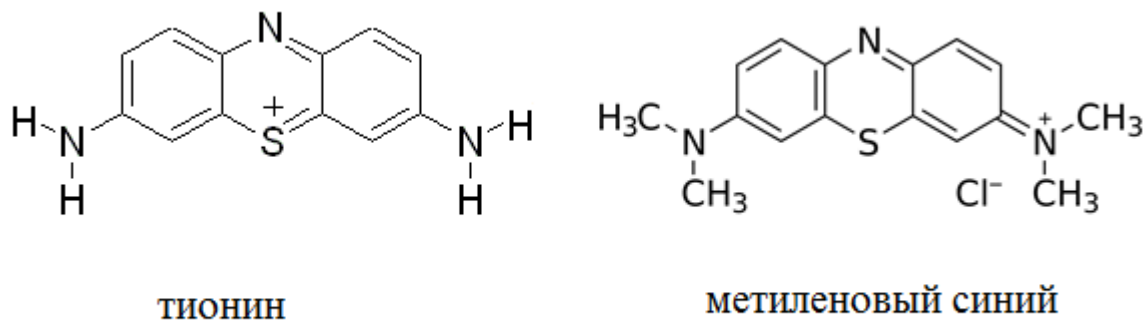


Схема 3. Химические структуры тионина и метиленового синего.

Известно, что тиониновые соединения (в том числе - МС) связываются с ДНК преимущественно интеркаляционным способом [196,203]. При этом, тионин проявляет специфичность к гуанин-цитозиновым последовательностям ДНК [204-206]. Обнаружено, что тионин может служить в качестве нейтрализатора заряда импеданса, основанного на ДНК-биосенсорах, поскольку может связываться и с дц-, и с оц-ДНК [207,208].

В последние десятилетия биоаналитические методы широко развиваются, поскольку для молекулярного распознавания в них используются нуклеиновые кислоты (НК), синтетические и природные олигонуклеотиды [209]. В основе этих методов лежит взаимодействие поли- или олигонуклеотидов (в том числе дц- и оц-ДНК) с высоко- или низкомолекулярными веществами природного или синтетического происхождения. Эти методы направлены на решения медицинских или биотехнологических проблем, связанных с различными заболеваниями или генетической диагностикой [210-216].

Биосенсорные технологии позволяют установить последовательность нуклеиновых кислот, являющихся мишенями для различных микроорганизмов или вирусов, а также эти технологии применяются для установления

генетического сродства, для определения врожденных генетических аномалий в ранние периоды развития плода и др. [210-216].

Для решения большинства этих задач применяются различные зонды, которые представляют собой низкомолекулярные вещества, механизмы взаимодействия которых должны быть известными. С этой точки зрения, в настоящее время многие лиганды получили новое применение. Среди таких веществ широко применяются акридиновые (например профлавин, акридиновый оранжевый), тиониновые (тионин, его производное метиленовый синий и др.) вещества [210-216].

3.3.1. Плавление комплексов ДНК с МС

МС (схема 3), как и АО, является фоточувствительным соединением и часто применяется в качестве альтернативы БЭ. МС, наряду с АО, используется в фотодинамической терапии (ФДТ). Несмотря на широкое применение этого лиганда в различных исследовательских лабораториях, основной механизм связывания МС с ДНК в настоящее время еще точно не установлен (см. [14,15]).

С другой стороны можно считать подтвержденным факт электростатического взаимодействия МС с фосфатными группами ДНК. Вследствие этого происходит фотоокислительное повреждение последней, поскольку связанные молекулы МС через триплет-триплетный перенос энергии активируют синглетный кислород (растворенный), который вызывает разрывы в обоих нитях ДНК [17]. Этот эффект лежит в основе ФДТ, применяемой для лечения различных болезней, в том числе – опухолевых, а также вирусных и др. [17,18].

Одним из принятых механизмов связывания МС с ДНК является интеркаляция в ее чередующиеся ГЦ последовательности. Однако в некоторых

исследованиях основным способом принимается связывание МС в малом желобке ДНК (желобковое связывание) (см. [14]).

Для выяснения молекулярных механизмов взаимодействия этого лиганда с ДНК нами проводились исследования комплексов методом плавления при ионных силах раствора 0,002 М и 0,02 М, основываясь на тот факт, что проявление того или иного механизма зависит от ионной силы раствора, типа нуклеотидных пар ДНК и концентрационного соотношения лиганд/ДНК [15].

Кривые плавления комплексов ДНК-МС (кривые не приводятся) сдвинуты в сторону высоких температур, как и в случае БЭ, при этом наблюдается изменение крутизны кривых плавления. В частности, по мере увеличения концентрации МС крутизна этих кривых уменьшалась, однако, по сравнению с БЭ, этот эффект был намного меньше.

Для анализа экспериментально полученных данных по взаимодействию МС с ДНК в рамках приведенной выше теории, нами рассчитаны значения $\delta(1/T_m)$ и $\delta(\Delta T/T_m^2)$, кривые зависимостей которых от r , полученные при ионной силе раствора 0,02 М, приведены на рис. 29. Зависимость $\delta(1/T_m)$ от r линейно увеличивается, так как температура плавления комплексов возрастает по мере увеличения концентрации лиганда, что отражает стабилизирующее влияние МС на дц-структуру ДНК (кривая 1 на рис. 29). Однако, кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r претерпевает небольшое приращение при низких концентрациях лиганда и приобретает постоянное значение при $r \geq 0,1$.

Из этих данных становится ясно, что МС не ведет себя так, как мультимодальный лиганд (как БЭ) при ионной силе раствора 0,02 М и связывается с ДНК ограниченным числом способов, при этом наиболее вероятно, что проявляется всего два типа взаимодействий – сильный полуинтеркаляционный и слабый электростатический. Это заключение основано на том, что зависимость $\delta(1/T_m)$ возрастает в интервале изменения

$0 < r \leq 0,33$, а зависимость $\delta(\Delta T/T_m^2)$, претерпевая небольшое увеличение, выходит на плато.

Небольшое увеличение $\delta(\Delta T/T_m^2)$ можно объяснить с точки зрения перераспределения связанных молекул МС с денатурированными на еще неденатурированные участки. При этом, основываясь на то, что $\delta(\Delta T/T_m^2)$ возрастает в интервале $r \leq 0,1$, мы заключаем, что существует специфический способ связывания с ограниченным числом мест связывания (сильный способ), после насыщения которых МС с ДНК начинает связываться неспецифически. МС, также, как и БЭ, Н33258, является катионным веществом и с фосфатными группами НК может связываться электростатически, как было показано выше.

Этот способ представляет собой неспецифический тип взаимодействия, поскольку для его реализации не требуются специфические центры связывания, например 5'-пиримидин-3'-пурин последовательности для интеркаляции в случае БЭ (см. [4,217]), или ГЦ-последовательности для интеркаляции АМД (см. [94,218]) или АТ последовательности для локализации Н33258 (см. [219]). Сильный способ связывания МС с дц-ДНК не соответствует АТ специфичности, которая указана в литературе (см. [17]).

Более того, МС, как тиониновые и акридиновые соединения, предпочтительнее взаимодействует с ДНК интеркаляционным механизмом (см. [220]), что и лежит в основе сильного способа связывания при ионной силе раствора 0,02 М. Однако небольшую величину $\delta(\Delta T/T_m^2)$ нельзя считать результатом интеркаляционного способа связывания, так как при полной интеркаляции молекула лиганда «сшивает» противоположные нити дц-ДНК, а также образует стекинг контакты с парами оснований над и под интеркаляционным участком [164].

Вследствие этого, для разрушения дц- структуры и расхождения нитей ДНК требуется значительное увеличение тепловой энергии (вследствие чего

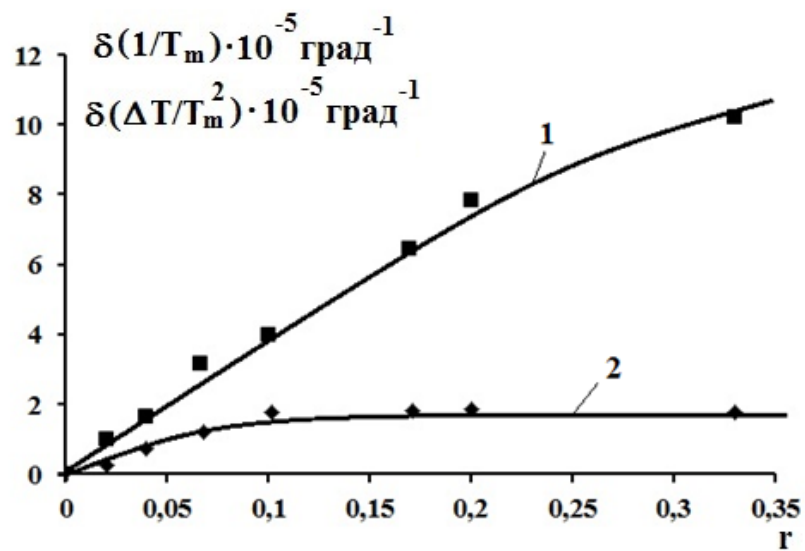


Рис. 29. Кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ (1) и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (2) от r комплексов МС-ДНК, полученные при ионной силе раствора 0,02 М, рН=7,0.

T_m комплексов увеличивается), с другой стороны процесс плавления затягивается (ΔT увеличивается) за счет перераспределения молекул лиганда с денатурированных на еще неденатурированные участки из-за увеличения гетерогенности энергии стекинг взаимодействий [164]. Очевидно, что эти факторы должны приводить к существенному возрастанию ΔT комплексов ДНК с интеркаляторами, что и обнаруживается в случае БЭ, АМД, однако в случае МС этот эффект слабо проявляется. На основании этих рассуждений мы заключаем, что сильный способ, имеющий интеркаляционную природу, в указанных условиях должен соответствовать неполной интеркаляции (полуинтеркаляции) МС в ДНК. Этим можно объяснить, в частности, интересный результат, приведенной в работе [220], в которой показано, что при интеркаляции МС в ДНК имеет место уменьшение интенсивности флуоресценции относительно интенсивности постсвечения свободных молекул лиганда.

С точки зрения полной интеркаляции этого лиганда в ДНК, как и в случае других интеркаляторов (БЭ, АМД, ПФ, АО и др), интенсивность флуоресценции должна увеличиваться. Эти особенности флуоресценции присущи многим лигандам, состоящим в основном из гидрофобных сердцевин (акридиновые, тиониновые, фенанхтридиновые или нафталиновые структуры в случае моноинтеркаляторов) (см. главу 1 и [221]).

Если же исходить из неполной интеркаляции молекул МС в ДНК, уменьшение флуоресценции может иметь место вследствие того, что в этом состоянии молекулы лиганда находятся в таком расстоянии от отрицательно заряженных фосфатов ДНК, что попадают в их электроотрицательное поле, вследствие чего наблюдается частичное тушение флуоресценции [220,221].

Проявление всего двух способов (полуинтеркаляционного и электростатического) связывания МС с ДНК при ионной силе раствора 0,02М подтверждается данными, полученными при ионной силе раствора 0,002 М и представленными на рис 30. Кривая 1, соответствующая изменению $\delta(1/T_m)$ от Γ

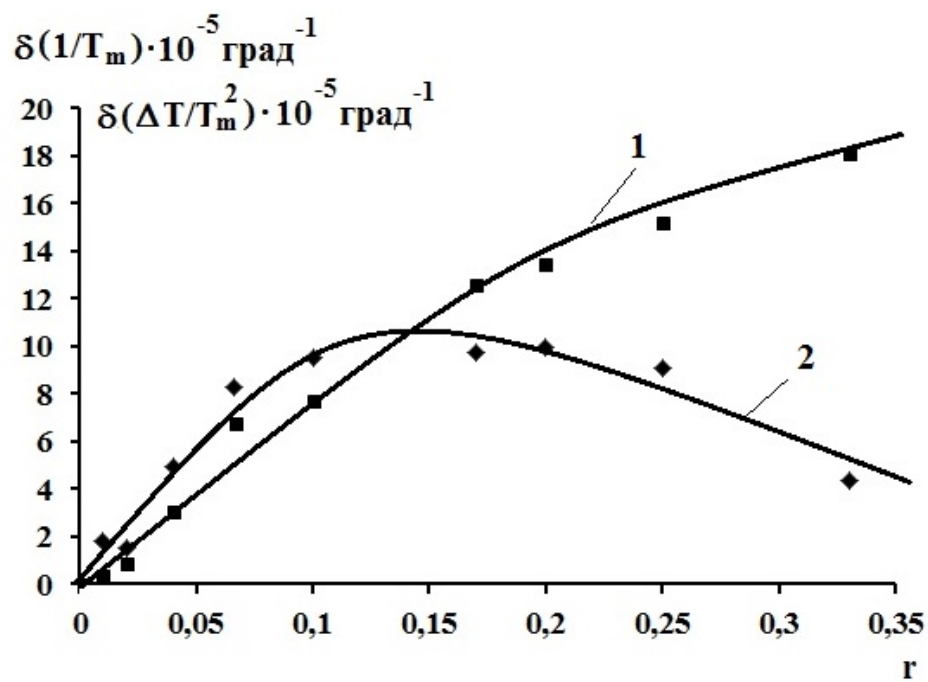


Рис. 30. Кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ (1) и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (2) от r комплексов МС-ДНК, полученные при ионной силе раствора 0,002 М, рН=7.0.

так же, как и при ионной силе раствора 0,02 М, возрастает, однако при относительно больших ионных силах отклоняется от линейности при $r \geq 0,2$, как и в случае БЭ. Более того, и кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (кривая 2) от r претерпевает колоколообразное изменение, как в случае БЭ. Анализ полученных экспериментальных значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$ в рамках разработанной модели для мультимодального лиганда выявляет соответствие с теоретически рассчитанными величинами, что позволяет заключить, что МС при ионной силе раствора 0,002 М, взаимодействует с ДНК как мультимодальный лиганд.

Другим важным результатом является то, что МС при низких ионных силах раствора полностью интеркалирует в плоскость между парами оснований. При этом, полученные данные выявляют еще один важный факт: МС не проявляет выраженную специфичность к определенным типам пар оснований, как и БЭ. С другой стороны, как и в случае БЭ, при полуинтеркаляционном способе связывания с дц-ДНК этот лиганд проявляет некоторую предпочтительность к ГЦ богатым участкам (см. [222]).

Полученные данные также выявляют, что при больших концентрациях МС основным способом связывания с ДНК является электростатический. Тем не менее, полученные данные не исключают возможность проявления специфичности МС к АТ парам ДНК, а также других способов связывания.

Таким образом, полученные данные по взаимодействию неклассического интеркалятора МС с ДНК позволяют нам делать следующие обобщения:

- при ионной силе раствора $\mu=0,02$ М, нейтральном рН, МС с ДНК связывается полуинтеркаляционным и электростатическим способами;
- в указанных условиях МС не проявляет специфичность к определенным парам или участкам ДНК;
- полуинтеркаляционные места связывания на ДНК для молекул МС ограничены и при их насыщении основным становится электростатическое связывание;

- при указанной выше ионной силе раствора этот лиганд не проявляет мультимодальность при взаимодействии с ДНК;
- при ионной силе раствора $\mu=0,002$ М, нейтральном рН, МС проявляет мультимодальность при взаимодействии с ДНК и, наряду с полуинтеркаляционным и электростатическим, связывается с дц-ДНК также интеркаляционным способом.

Приведенные в этом параграфе данные ни в коем случае не претендуют на абсолютность и могут быть дополнены новыми результатами, которые помогут более полноценно описать молекулярные механизмы взаимодействия МС с ДНК и понимать особенности, лежащие в основе биологической активности этого вещества.

Полученные нами данные, вкупе с литературными могут стать основой для решения различных вопросов, касающихся практического применения МС, а также других лигандов в различных целях (биомедицинских, нанотехнологических, ДНК-сенсорных и др).

3.4. Исследование одновременного связывания двух типов лигандов с ДНК

В настоящее время актуальными являются вопросы, касающиеся одновременного взаимодействия лигандов более чем одного типа с ДНК, поскольку она в клетке окружена множеством различных соединений. Эти вопросы актуальны и с той точки зрения, что лиганды различной структуры и способов связывания, применяемые особенно в химиотерапии, в большинстве случаев имеют высокотоксичное влияние на организм. Эти исследования становятся особенно важными, так как дозировка таких лекарственных препаратов играет ключевую роль в лечении опухолевых заболеваний.

С этой точки зрения, исследования для выяснения влияния комплексных веществ (мультилекарственных препаратов) на структуру и функции ДНК являются необходимыми. Эти исследования также важны и для разработки таких систем, которые будут иметь низкую токсичность и более эффективное (по сравнению с одним типом БАС) влияние на организм. Эти вопросы находятся в поле постоянного интереса специалистов в области медицины, биохимии, биофизики. Более того, комплексообразование смеси лигандов различной природы с ДНК представляет интерес и в быстроразвивающейся области биоэлектроники [223-225].

Как в любой области науки, здесь также фундаментальные исследования становятся важными, особенно в тех случаях, когда необходимо выяснить влияние одного лиганда на структурно-функциональные свойства ДНК в присутствии другого (других). Для выяснения этих проблем необходимо учитывать тот факт, что многие обратимо связывающиеся лиганды могут проявить побочные эффекты (цитотоксичность, нейротоксичность, нефротоксичность или кардиотоксичность).

Поэтому и возникает вопрос, связанный с уменьшением токсичности отдельного лиганда с помощью модулирования его влияния на организм посредством другого [226-228]. В этом аспекте становится актуальным

теоретическое обоснование способов конструирования соединений, которые, с одной стороны, могут быть более чувствительны и специфичны к ДНК, с другой стороны, менее токсичны и эффективны с прикладной точки зрения [227].

Возможны два подхода в этом направлении - химическое сцепление двух различных лигандов, например интеркаляторов, интеркалятора и неинтеркалятора, неинтеркаляторов, или изучение взаимодействия таких веществ, не связанных между собой химическими связями. Для дальнейшего развития теоретических моделей, описывающих взаимодействие мульти-лиганд комплексов с ДНК фундаментальными могут стать экспериментальные данные и теоретические модели, развитые для мультимодального лиганда, или описывающие связывание двух различных лигандов с ДНК [104,229].

3.4.1. Совместное связывание классического интеркалятора БЭ и классического желобково связывающегося соединения Hoechst 33258 с ДНК.

Выше показано, что при ионной силе раствора 2 мМ кривая зависимости изменения ширины интервала плавления $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r комплексов БЭ с ДНК имеет колокообразную форму, а в случае Н33258 возрастает при низких концентрациях этого лиганда и, начиная с некоторых значений r ($r \geq 0,10$), стремится к постоянной величине. В то же время, температура плавления (T_m) комплексов ДНК как с EtBr, так и с Н33258, монотонно растет в интервале изменения r - $0 \leq r \leq 0,33$, вследствие стабилизации двухцепочечной (дц) структуры ДНК. Как отмечено выше, большой теоретический и экспериментальный интерес представляет выявление того, как лиганды будут влиять на термодинамические параметры перехода спираль-клубок при совместном связывании с ДНК. С этой целью исследовались комплексы БЭ-ДНК-Н33258 с помощью температурного плавления. Как видно из рис. 31 А, кривая зависимости $\delta(1/T_m)$ от r , полученная при ионной силе раствора 2 мМ на

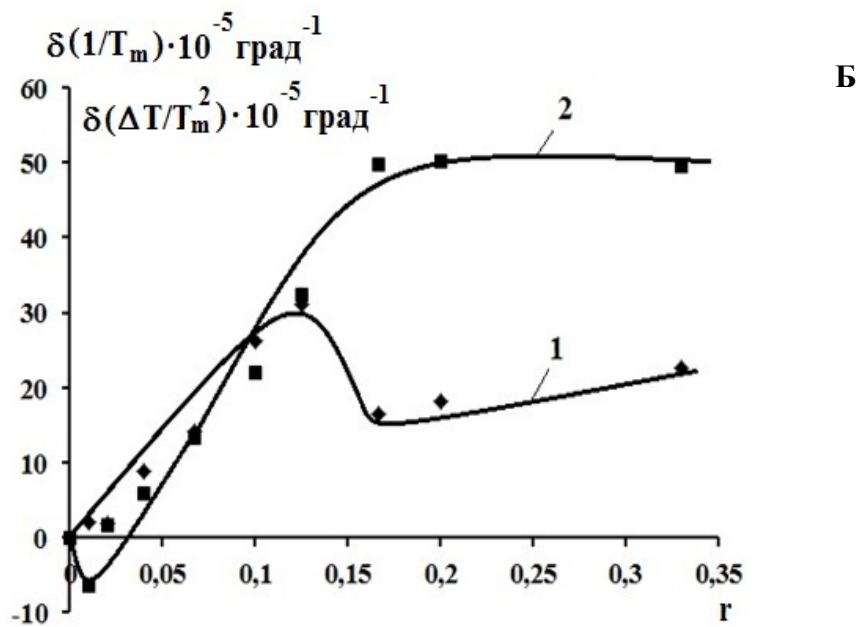
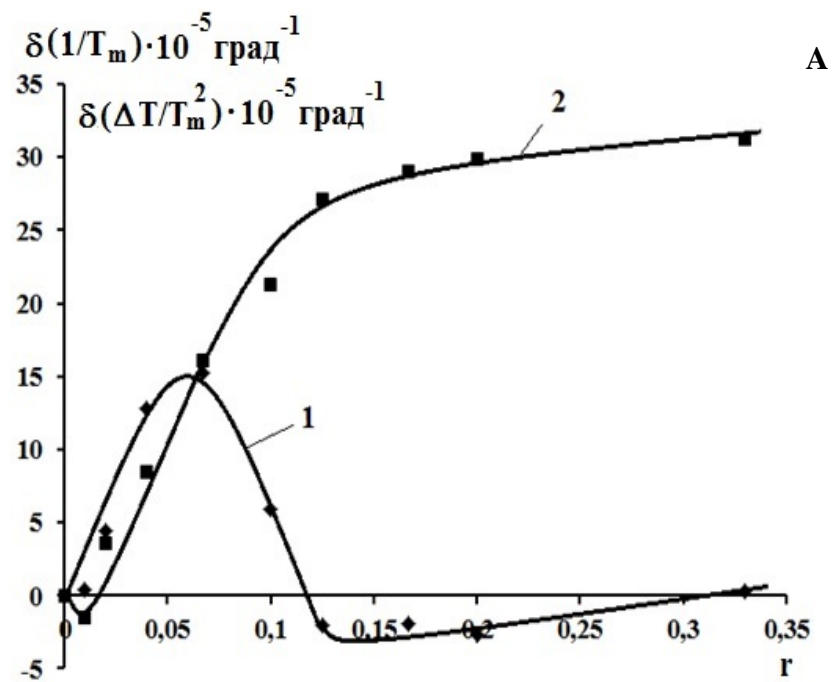


Рис. 31. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (1) и $\delta(1/T_m)$ (2) от γ комплексов БЭ-ДНК-Н3325 (А) и БЭ-ДНК+Н3325-ДНК (Б), полученные при ионной силе раствора 0,002 М, рН=7.0.

основании кривых плавления ДНК и ее комплексов с этими лигандами (кривые плавления не приведены), возрастает при низких концентрациях обоих лигандов, однако, при $r > 0,10$, эта зависимость претерпевает незначительное увеличение (практически приобретает постоянные значения). Такая же зависимость получается при простом сложении значений этого параметра, полученных для комплексов БЭ-ДНК и Н33258-ДНК в аналогичных условиях (рис. 31 Б). Однако величина изменения $\delta(1/T_m)$ от r при совместном взаимодействии этих лигандов не является простой суммой значений $\delta(1/T_m)$ и примерно в полтора раза меньше, чем при сложении этих значений, полученных для комплексов БЭ-ДНК и Н33258-ДНК. Интересным является то, что при совместном взаимодействии БЭ и Н33258 с ДНК $\delta(1/T_m)$ от r имеет такие же значения, как при их отдельном взаимодействии (рис. 19 и 24, кривые 1). Этот факт можно объяснить тем, что стабилизирующее влияние каждого из этих лигандов ограничивается присутствием другого. При этом установленная структура БЭ-ДНК-Н33258 представляет собой такую систему, которая качественно различается от систем БЭ-ДНК и Н33258-ДНК. Такое отличие можно объяснить с точки зрения, если рассмотреть эти системы как одномерные кристаллы [161]. Очевидно, что тройная система является более гетерогенной, чем двойная система, вследствие чего, несмотря на стабилизацию со стороны обоих лигандов, переход из кристаллического в жидкоподобное состояние происходит при практически таких же температурах, как и в отсутствие одного из них. Этот вывод, хотя и требует дальнейшего детального исследования, однако недалек от реальности, поскольку в этом случае в кристаллической структуре тройных систем обязательно существуют неупорядоченные (разрыхленные) участки, особенно на границах участков, занятых молекулами лигандов разного типа. При этом, этот эффект может быть также обусловлен различными механизмами связывания этих лигандов (полной

интеркаляцией и другими механизмами в случае БЭ и неклассической интеркаляцией в случае Н33258).

Установление более гетерогенной структуры тройной системы БЭ-ДНК-Н3325 подтверждается и тем, что кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r колоколообразная (рис. 31 А, 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, на котором образуются максимум и минимум (рис. 31 Б, кривая 1). Из рис. 33 А видно, что зависимость $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r возрастает при низких концентрациях лигандов ($r \geq 0,067$), однако при дальнейшем увеличении значений r эта кривая уменьшается, приобретая отрицательные значения в интервале $0,12 < r \leq 0,3$, после чего практически становится равной нулю. Указанные особенности зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r с одной стороны схожи с аналогичными особенностями, полученными для этого параметра в случае комплексов ДНК-БЭ, с другой стороны, количественно они сильно отличаются. Так, максимум на кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r комплексов БЭ-ДНК-Н33258 соответствует такому значению r ($r \approx 0,05$), при котором в случае отдельного взаимодействия обоих лигандов наблюдается возрастание этого параметра. Этот факт объясняется, если учесть, 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. Однако, при небольшом увеличении концентраций обоих лигандов, места связывания для каждого из них на ДНК сближаются, при этом возникает конкуренция между ними за эти места связывания, в то время как в случае одного лиганда такая конкуренция не может возникнуть даже в случае существования нескольких способов связывания (см. Главу 2), несмотря на то, что в этом случае один и тот же лиганд, как и в случае двух различных

лигандов, будет иметь разные константы равновесного связывания с ДНК, соответствующие этим способам.

Весьма интересным и 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 $0,12 < r \leq 0,3$ вследствие того, что БЭ с ДНК связывается другим способом (скорее всего полуинтеркаляционным), который проявляется при насыщении мест связывания интеркаляционным способом. При этом очевидно, что полуинтеркаляционный способ связывания БЭ с ДНК проявляется при намного низких концентрациях и стимулируется со стороны Н33258. Этот эффект отражается и на суммарной кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ при $0,125 < r \leq 0,3$ (рис. 31 Б, кривая 1). Вероятнее всего, что при совместном взаимодействии обоих лигандов места связывания для них на дц-ДНК насыщаются при достаточно низких концентрациях лигандов, вследствие чего молекулы БЭ начинают связываться с и оц-участками нуклеиновой кислоты, в то время как молекулы Н33258 с этими участками не связываются.

Качественное изменение обнаруживается при увеличении ионной силы раствора на порядок. Из рис. 32 становится очевидным, что зависимость $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r уменьшается и, имея колоколообразную форму, приобретает отрицательные значения. При относительно больших ионных силах преобладающим является специфическое связывание Н33258 с АТ последовательностями ДНК, что приводит не только к уменьшению ширины интервала плавления его комплексов с ДНК, но и тройной системы БЭ-ДНК-Н33258. Очевидно, что при совместном взаимодействии обоих лигандов уже при низких концентрациях перераспределение связанных молекул БЭ с оц-участков ДНК на дц-участки (что и является основной причиной увеличения $\delta(\Delta T/T_m^2)$) или прекращается, или обусловленное этим процессом уширение ширины интервала плавления компенсируется сужением этого интервала из-за АТ специфического связывания Н33258. Возможна также конкуренция между

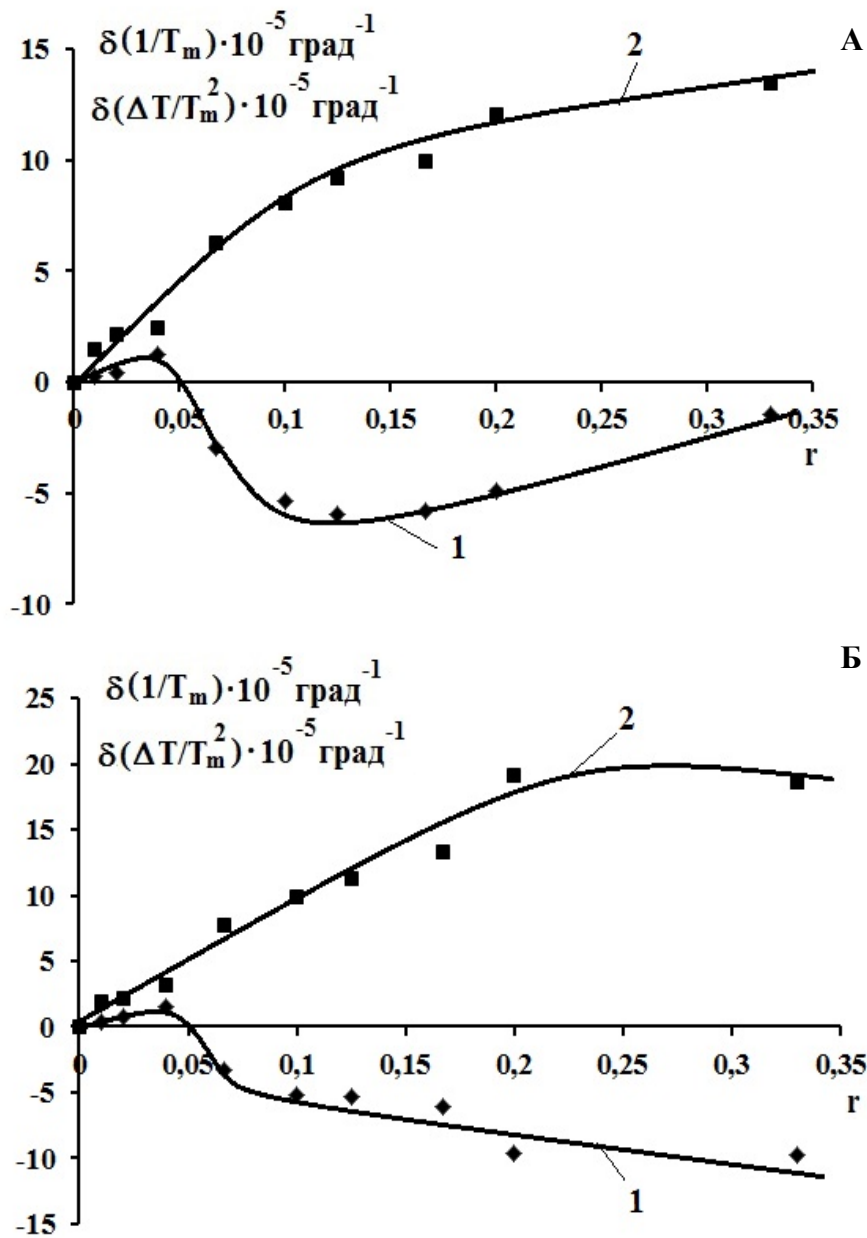


Рис. 32. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (1) и $\delta(1/T_m)$ (2) от r комплексов БЭ-ДНК-Н33258 (А) и БЭ-ДНК+Н33258-ДНК (Б), полученные при ионной силе раствора 0,02 М, рН=7,0.

этими лигандами за связывание с ДНК, вследствие чего молекулы БЭ не интеркалируют в дц-ДНК. Подтверждением этого факта является то, что и в случае комплексов Н33258-ДНК, и в случае тройной системы БЭ-ДНК-Н33258, кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r уменьшаются при значениях $r \leq 0,1$ (рис. 28, кривая 3 и рис. 32 А, кривая 1). Более того, из рис. 34 А видно, что в интервале $0 < r \leq 0,05$ на кривой 1 образуется небольшой участок, который имеет колоколообразную форму, что обусловлено тем, что при достаточно низких концентрациях лигандов конкуренция между ними еще не возникает, и места для интеркаляции БЭ в дц-ДНК доступны. По мере увеличения концентраций обоих лигандов $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r начинает возрастать, затем уменьшаться, стремясь к нулю (участок в интервале $0 < r \leq 0,05$, рис. 32 А). Аналогичный участок в указанном интервале изменения r образуется и на кривой, представляющей простую сумму значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$, соответствующих комплексам БЭ-ДНК и Н33258-ДНК (кривая 1, рис. 32 Б). Этот факт подтверждает вывод об отсутствии конкуренции между лигандами, вследствие чего влияние интеркалированных молекул БЭ на ширину интервала плавления тройной системы проявляется практически так, как при его отдельном связывании.

Фактически, в отсутствие конкуренции и существования центров связывания интеркаляционным способом для БЭ и АТ специфичности для Н33258 в избытке, $\delta(\Delta T/T_m^2)$ возрастает. По мере увеличения концентраций обоих лигандов эти центры связывания “сближаются” вдоль ДНК и начинают перекрываться, что приводит к тому, что интеркаляционные места для БЭ в ДНК блокируются (константа связывания Н33258 примерно на порядок больше, чем константа интеркаляционного связывания БЭ). Это приводит к уменьшению ΔT тройной системы, вследствие чего значения $\delta(\Delta T/T_m^2)$ становятся отрицательными. Однако, при дальнейшем увеличении концентраций лигандов специфические места связывания на ДНК для Н33258 насыщаются. В то же

время, в этих условиях БЭ начинает связываться с ней, занимая те участки, которые не блокированы молекулами Н33258. По ходу плавления возможно перераспределение связанных с этими участками молекул БЭ, а также образование комплексов с расплавленными участками, которые были блокированы молекулами Н33258, однако становились доступными из-за их диссоциации и вследствие этого $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r увеличивается, достигая нулевого значения. Этот эффект объясняется с помощью теории МСЛ, где показано, что, когда дц-участки на ДНК полностью заполнены, а оц-участки в избытке, начинает превалировать перераспределение связанных молекул БЭ с дц- на оц-участки, вследствие чего $\delta(\Delta T/T_m^2)$ опять начинает возрастать. Этот эффект становится ощутимым при больших значениях r , поэтому и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ увеличивается.

Кривая зависимости $\delta(1/T_m)$ от r тройной системы БЭ-ДНК-Н33258, как и при низких ионных силах раствора, возрастает по мере увеличения концентрации лигандов. Однако очевидно, что стабилизирующее влияние обоих лигандов на дц-ДНК при ионной силе раствора 0,02 М, как и при их отдельном взаимодействии с нуклеиновой кислотой, значительно слабее, что указывает на то, что помимо основных, эти лиганды и отдельно, и в присутствии другого, связываются с ДНК также электростатически.

С этой точки зрения, при относительно больших концентрациях соли электроотрицательный заряд фосфатных групп ДНК нейтрализуется и двойная спираль становится более компактной и стабильной. Вследствие этого при относительно высоких ионных силах раствора приращение T_m под воздействием катионных лигандов меньше, чем при низких ионных силах.

Тем не менее, и при ионной силе раствора 0,02М величина $\delta(1/T_m)$ тройной системы БЭ-ДНК-Н33258 вдвое меньше, чем величины этого параметра, полученного при сложении значений $\delta(1/T_m)$, соответствующих комплексам БЭ-ДНК и Н33258-ДНК. При этом, из рис. 32 Б видно, что кривая

зависимости $\delta(1/T_m)$ тройной системы возрастает в указанном интервале изменения r (рис. 32 А, кривая 2), в то время кривая 2, приведенная на рис. 34 Б, выходит на плато, с тенденцией к уменьшению.

Таким образом, на основании экспериментальных данных по плавлению тройной системы БЭ-ДНК-Н33258 можно заключить, что:

- в случае совместного взаимодействия классического интеркалятора БЭ и классического неинтеркалятора Н33258 с ДНК, определяющее влияние на способы их связывания имеет ионная сила раствора;
- совместное взаимодействие БЭ и Н33258 с ДНК не является простой суммой их отдельного связывания;
- при совместном взаимодействии с ДНК возникает конкуренция между БЭ и Н33258;
- БЭ проявляет мультимодальность при связывании с ДНК в присутствии Н33258;
- совместное взаимодействие БЭ и Н33258 с ДНК не является результатом связывания по крайней мере двумя способами одного типа лиганда.

3.4.2. Совместное взаимодействие интеркаляторов бромистого этидия и метиленового синего с ДНК

Совместное взаимодействие БЭ и МС с ДНК, как и в случае тройной системы БЭ-ДНК-Н33258, исследовано методом УФ-плавления при ионных силах раствора 0,002 и 0,02 М. Кривые плавления тройной системы БЭ-ДНК-МС гладкие, как аналогичная кривая ДНК и сдвинуты в сторону высоких температур (эти кривые не приводятся).

Из этих кривых определены значения температуры плавления и ширины интервала плавления и из этих величин рассчитаны $\delta(1/T_m)$ и $\delta(\Delta T/T_m^2)$. Кривые

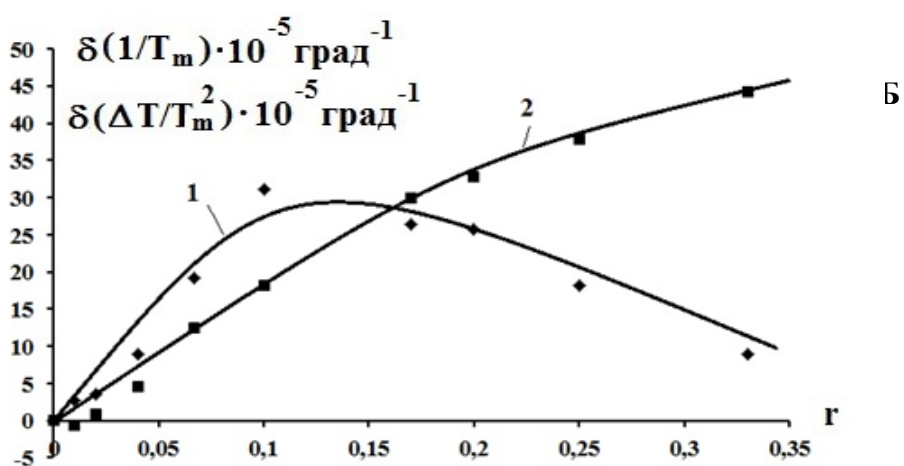
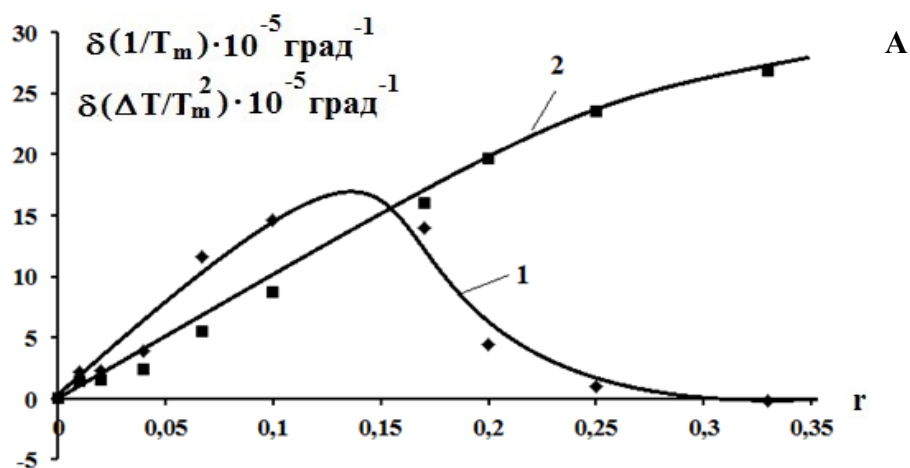


Рис. 33. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (1) и $\delta(1/T_m)$ (2) от γ тройной системы БЭ-ДНК-МС (А) и БЭ-ДНК+МС-ДНК (Б), полученные при ионной силе раствора 0,002 М, рН=7.0.

зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (1) и $\delta(1/T_m)$ (2) от r , полученные при ионных силах 0,002 М и 0,02 М приведены на рис. 33 и 34 соответственно. Из рис. 33 видно, что при совместном связывании БЭ и МС зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (кривая 2) и $\delta(1/T_m)$ (кривая 1) от r по форме практически совпадают с аналогичными кривыми, полученным для обоих лигандов при отдельном связывании с ДНК. Из рис. 33 также видно, что кривые зависимости $\delta(1/T_m)$ (А и Б) от r возрастают в интервале $0 < r \leq 0,33$, проявляя тенденцию насыщения при высоких концентрациях лигандов. Однако значения этого параметра, соответствующего тройной системе БЭ-ДНК-МС, как и в случае БЭ-ДНК-Н33258, меньше (примерно вдвое), чем аналогичное значение, полученное при математическом сложении значений $\delta(1/T_m)$, соответствующих комплексов БЭ-ДНК и МС-ДНК.

В указанном интервале изменения r кривая зависимости $\delta(1/T_m)$, соответствующая комплексам БЭ-ДНК, резко возрастает (рис. 22, кривая 1), в то время как в случае комплексов МС-ДНК эта кривая проявляет тенденцию насыщения и схожа с той же кривой тройной системы БЭ-ДНК-МС. Тем не менее, схожее поведение кривых зависимости $\delta(1/T_m)$ от r комплексов МС-ДНК и тройной системы БЭ-ДНК-МС не является результатом эффекта доминирующего влияния МС (или БЭ) на температуру плавления тройной системы. Мы полагаем, что экспериментально полученные результаты зависимости $\delta(1/T_m)$ от r тройной системы БЭ-ДНК-МС отражают конкуренцию между этими лигандами за места связывания.

Существование конкуренции между БЭ и МС выявляется также из результатов, полученных для зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r . Как видно из рис. 33 (А и Б), кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r колоколообразные, как те же кривые, полученные для комплексов БЭ-ДНК и МС-ДНК (см. рис. 23 и 30, кривая 2), однако, зависимость $\delta(\Delta T/T_m^2)$, полученная для тройной системы БЭ-ДНК-МС различается от них (рис. 33 А), а также от той же кривой, представляющий математическую сумму (рис. 33 Б). Примечательно то, что

кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r тройной системы БЭ-ДНК-МС возрастает в интервале $0 < r \leq 0,15$, затем, в интервале $0,15 < r \leq 0,33$ резко понижается, в то время как кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ комплексов БЭ-ДНК и МС-ДНК, а также их суммарная кривая возрастают в интервале $0 < r \leq 0,2$, а в интервале $0,2 < r \leq 0,33$ начинают плавно уменьшаться. Более того, значения $\delta(\Delta T/T_m^2)$ тройной системы БЭ-ДНК-МС намного меньше, чем эти же значения комплексов БЭ-ДНК в указанных интервалах изменения r . Более того, при $r \approx 0,3$ эта зависимость равняется нулю. Этот экспериментальный факт, с точки зрения существования конкуренции за интеркаляционные и полуинтеркаляционные места связывания, является результатом насыщения этих мест, которое достигается при намного меньших концентрациях этих лигандов, поэтому и $\delta(\Delta T/T_m^2)$ резко уменьшается. Интересный результат получен при совместном взаимодействии БЭ и МС при ионной силе раствора 0,02 М. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (1) и $\delta(1/T_m)$ (2) от r (рис. 34 А) качественно различаются от таковых, соответствующих комплексам БЭ-ДНК и МС-ДНК. Более того, алгебраические суммы кривых также различаются от экспериментальных, полученных для тройной системы БЭ-ДНК-МС (рис. 34 Б).

Из рис. 36 А видно, что кривую зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r можно разбить на два участка: при низких концентрациях лигандов (в интервале изменения $0 < r \leq 0,15$) эта кривая увеличивается (при этом, примерно вдвое меньше, чем при сложении значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$, полученных для комплексов БЭ-ДНК и МС-ДНК), затем выходит на плато, а при относительно больших концентрациях лигандов (в интервале $0,15 < r \leq 0,33$) эта кривая становится колоколообразной, не достигая нулевого значения.

Этот результат отчетливее выявляет конкурентное взаимодействие БЭ и МС с ДНК, особенно при их не очень больших концентрациях. Это подтверждается тем, что и на кривой зависимости $\delta(1/T_m)$ (рис. 34 А, кривая 2), в указанном интервале изменения r образуется аналогичный участок: эта кривая

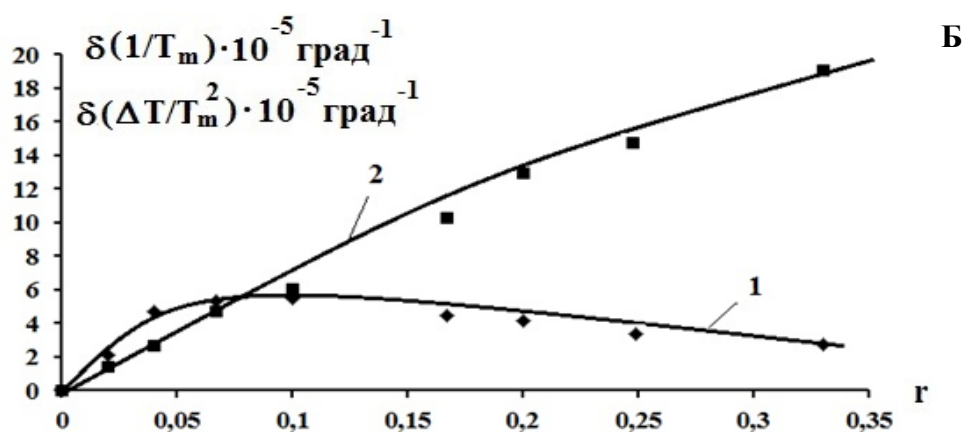
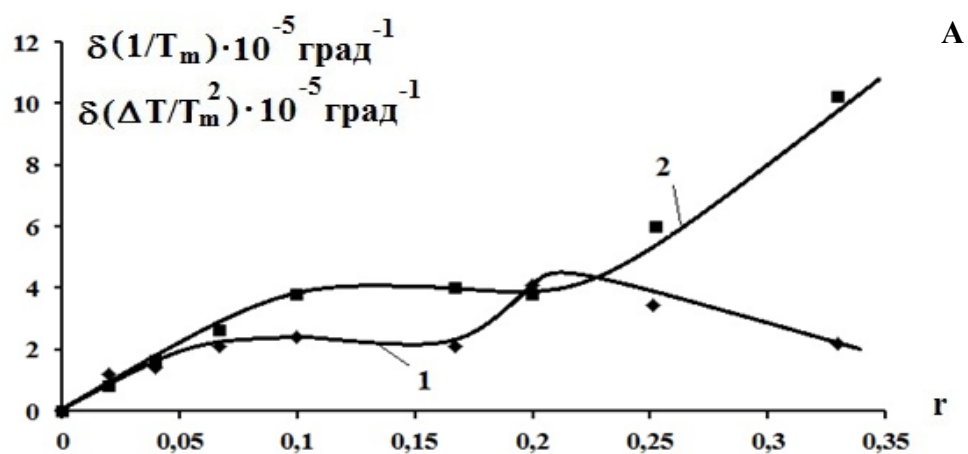


Рис. 34. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ (1) и $\delta(1/T_m)$ (2) от γ комплексов БЭ-ДНК-МС (А) и БЭ-ДНК+МС-ДНК (Б), полученные при ионной силе раствора 0,02 М, рН=7,0.

возрастает при низких концентрациях лигандов и выходит на плато. При значительно низких концентрациях лигандов дц-структура ДНК стабилизируется (T_m , а также ΔT возрастают), однако, дальнейшее увеличение концентрации лигандов останавливает возрастание T_m и ΔT , скорее всего из-за протовоположного влияния указанных лигандов на эти параметры при совместном связывании. Второй, колоколообразный участок на кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ тройной системы БЭ-ДНК-МС в интервале $0,15 < r \leq 0,33$ является результатом вытеснения связанных молекул МС со стороны БЭ. Полученные выше данные выявили, что при ионной силе раствора $0,02$ М МС с ДНК связывается полуинтеркаляционным и электростатическим способами, в то время как БЭ проявляет все присущие этому лиганду способы, в результате чего кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r и колоколообразная. Следовательно, ход кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ тройной системы БЭ-ДНК-МС в интервале $0,15 < r \leq 0,33$ может быть результатом отдельного влияния БЭ на этот параметр. При этом, кривая зависимости $\delta(1/T_m)$ в этом интервале резко возрастает, что имеет место при отдельном связывании БЭ с ДНК. Более того, значения $\delta(1/T_m)$ при отдельном и совместном с МС связывании БЭ в интервале $0,15 < r \leq 0,33$ практически одинаковые (рис. 22, кривая 3 и рис. 34 А, кривая 2)

Полученные результаты позволяют сделать следующие обобщения:

- в случае совместного взаимодействия интеркаляторов БЭ и МС с ДНК кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r не является простой суммой этих зависимостей при отдельном связывании указанных лигандов;
- влияние одного из лигандов на параметры плавления ДНК при отдельном взаимодействии различается от его же влияния в присутствии другого;
- при совместном взаимодействии превалирующим становится влияние того лиганда, сродство которого с ДНК больше;
- ионная сила раствора влияет на проявление интеркаляционного способа связывания МС с ДНК и в присутствии БЭ;

- при совместном взаимодействии интеркаляторов БЭ и МС с ДНК возникает конкуренция;
- при совместном взаимодействии, при ионной силе раствора 0,002 М и БЭ, и МС связываются с ДНК тремя способами, а при ионной силе раствора 0,02 М – БЭ связывается тремя, МС – двумя способами, как при отдельном взаимодействии;
- при совместном взаимодействии с ДНК проявление способов связывания БЭ не зависит от ионной силы раствора и от присутствия МС.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований комплексов ДНК с двумя различными лигандами выявляют некоторые структурно-функциональные особенности ДНК. Очевидно, что непосредственное связывание любого лиганда с ДНК оставляет обособленное влияние на ее структурно-функциональные характеристики, однако совместное связывание двух 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 выяснить 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.

ГЛАВА 4

ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С ЛИГАНДАМИ

Известно, что генетическая функция ДНК регулируется под влиянием различных соединений (лигандов) – белков и других молекул, которые связываются с ее различными участками и могут ингибировать или инициировать работу генов. С этой точки зрения лиганды являются теми инструментами клетки, которые участвуют в процессах сохранения, эффективной экспрессии и своевременного востребования генетической информации. С помощью лигандов «включается» или «выключается» считывание генов, в результате чего образуются сложные субклеточные структуры [230,231].

Для реализации процессов регуляции генов с участием низкомолекулярных соединений необходимо координированное действие между различными лигандами. Однако такая координация с точки зрения равновесной термодинамики не всегда возможна, поскольку связывание лигандов с макромолекулами является случайным процессом. При этом необходимо также учитывать, что в живой клетке ДНК одновременно взаимодействует не только с регуляторными белками, но и с различными поли- и олигомерными, а также различными низкомолекулярными соединениями, при этом основная ее часть находится в плотно упакованном состоянии в хромосомах [231]. Фактически, связывание лигандов с ДНК представляет собой статистическое, а регуляторные процессы реализации генетической информации с участием лигандов – организованное явление.

Тем не менее, противоречие между этими явлениями можно решить с помощью физической теории адсорбции, основываясь на том, что НК (ДНК и РНК) практически имеют структуру регулярных матриц и содержат реакционные центры, в которых «записаны» определенные сигналы, способствующие связыванию лигандов с ними. На молекулярном уровне

связывание лигандов и, в первую очередь белков, является матричным процессом, с высокой комплементарностью за счет молекулярного узнавания взаимодействующих атомных или молекулярных групп. Следовательно, связывание лигандов на матрице можно представить в виде многоточечной координированной адсорбции. Такая адсорбция может быть обусловлена как кооперативными, так и некооперативными взаимодействиями [230,231].

Лиганды могут связываться с ДНК стереоспецифически с определенными участками, однако такие взаимодействия редкие и, в основном, большинство лигандов связывается с разными участками матрицы. В этом случае один лиганд может занять определенный участок на матрице, который станет недоступным для другого лиганда.

В том случае, если константы связывания с разными участками равны, то это можно представить как взаимодействие с гомополимером. Если же константы связывания с разными участками отличаются, то это является взаимодействием с гетерополимером: в обоих случаях применяются методы статистической термодинамики [231].

4.1. Модели связывания лигандов с ДНК

В настоящее время существуют различные модели описания равновесного связывания лигандов с макромолекулами (см. работы [232-234]). Так, в работах Гурского, Заседателева и др. в молекуле ДНК реакционные центры рассматриваются как решетки, с которыми связываются различные молекулы. Лиганды также несут реакционные центры в виде решетки, которые комплементарны к центрам связывания на ДНК [235-240]. По этой модели лиганд узнает участок на матрице и связывается с ним. При этом, в случае, если это связывание равновесное и обратимое, то этот процесс можно описать с помощью теории физической адсорбции.

Современный подход к описанию равновесного связывания лигандов с ДНК основан на указанных выше моделях, в которых связывание лигандов описывается уравнениями химического равновесия [241-244].

Для связывания лигандов с макромолекулами еще в середине XX века Джеральд Скетчард выдвинул четыре вопроса: «Сколько? Как сильно? Где? Почему?». Ответы на два первых вопроса дают способ Скетчарда для анализа связывания лигандов с макромолекулами. Ответ на третий вопрос в случае связывания лиганда с ДНК позволяет получить модель техники футпринтинга. Необходимо отметить, что диаграммы футпринтинга вместе с подходами генной инженерии являются достаточно точным методом, позволяющим локализовать места связывания лигандов на ДНК [245-247].

Ответ на четвертый вопрос требует предварительного вопроса «Как?» и описания способа связывания, то есть представить стереохимию связывания. При этом, эта стереохимическая схема может включить как один вариант связывания лиганда с центром посадки на ДНК, так и несколько вариантов. В целом, полный анализ связывания лигандов с ДНК можно представить с помощью схемы 4.

4.1.1. Решеточная модель адсорбции

При рассмотрении решеточной модели адсорбции молекула ДНК представляется как матрица в виде линейной одномерной решетки, с n -ными центрами адсорбции, которые называются местами связывания или реакционными центрами [235,236,242,248]. В зависимости от размеров ДНК, молекулы лиганда и природы взаимодействия, центрами адсорбции на матрице могут служить как отдельные атомы пар оснований, так и участки ДНК определенной длины. С другой стороны, молекулы лиганда также представляются как структуры, содержащие одну или несколько групп атомов,

Физическая модель адсорбции

- а. термодинамическое описание системы;
- б. решеточная модель адсорбции; модель молекулы матрицы, модель молекулы лиганда и схема связывания – модели взаимодействий лиганд-матрица, лиганд-лиганд и матрица-матрица.



Математическая модель адсорбции

- а. система соотношений, описывающих связывание (уравнения адсорбции)
- б. решение системы уравнений
- в. исследование связи между свойствами физической модели адсорбции и поведением модельных кривых связывания
- г. развитие методов и критериев анализа кривых связывания



Анализ данных, полученных из эксперимента при помощи теории адсорбции

- а. выбор модели адсорбции
- б. сравнение величин, рассчитанных теоретически с величинами, полученными экспериментально
- в. определение параметров модели
- г. интерпретация экспериментальных данных



Первичные экспериментальные данные

Схема 4. Взаимосвязь между стадиями анализа связывания лигандов с ДНК [231].

которые связываются с реакционными группами матрицы. Весь участок ДНК, который занимает одна молекула лиганда, принято считать местом связывания (рис. 35).

В реальных ситуациях взаимодействие ДНК и лиганда происходит произвольно, в зависимости от размеров ДНК, лиганда, участка ДНК, занимаемой молекулой лиганда, а также молекулярных масс ДНК и лиганда. При обратимом взаимодействии лигандов с ДНК ковалентные связи не образуются, вследствие чего энергия таких взаимодействий превышает значение $-kT$ всего в несколько раз [231].

Решетчатая модель позволяет описать как некооперативное (рис. 35а), так и кооперативное связывание лиганда с ДНК (рис. 35 б). Несмотря на отсутствие взаимодействия между молекулами лиганда, при насыщении потенциальных мест связывания, зачастую возникают стерические препятствия, что является основой для модели «взаимодействие с исключенными местами связывания», которая особенно справедлива для комплексов ДНК с интеркаляторами. В настоящее время общепринятым примером этой модели является комплекс ДНК с дистамицином А. Этот пример хорошо согласуется с физической теорией адсорбции лиганда на линейной матрице [249].

Анализ связывания лигандов с ДНК включает следующие поэтапные подходы (схема 4): физическая модель адсорбции, математическая модель адсорбции, анализ данных.

Физическая модель адсорбции. Анализ комплексообразования лигандов с ДНК в рамках физической модели проводится в растворе при постоянной температуре, постоянном химическом потенциале и давлении.

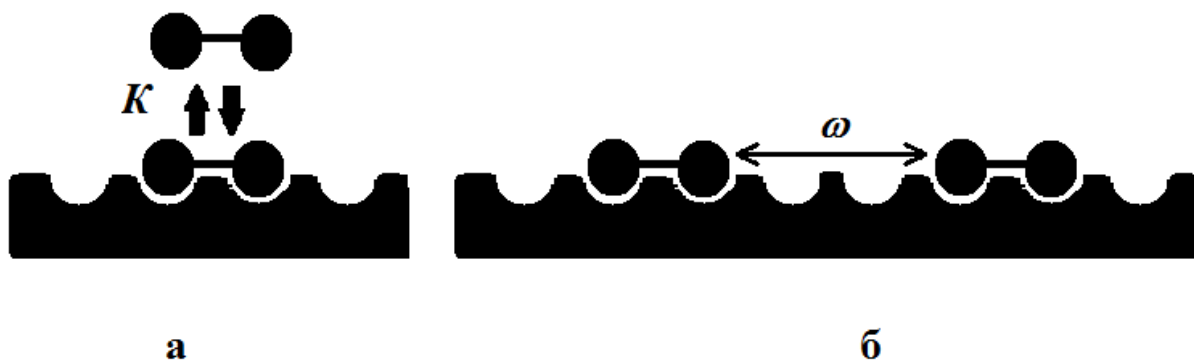


Рис. 35. Адсорбция лиганда на линейной, одномерной матрице.
 А. Обратимый переход лиганда в связанное состояние с константой K , в отсутствие взаимодействия между связанными лигандами; б. схема связывания лиганда с матрицей при существовании взаимодействий между связанными лигандами, ω - параметр кооперативности, описывающий это взаимодействие [231].

Основным термодинамическим параметром такой системы является свободная энергия - ΔG . При этом, рассматриваемая система является открытой и обозначается независимыми переменными μ , p и T , где μ - химический потенциал лиганда в растворе, p и T - давление и температура соответственно. Открытость системы обусловлена тем, что молекулы лиганда адсорбируются на матрице или десорбируются с нее. В целом, при физической модели адсорбции важным является установление равновесного состояния [231].

Математическая модель адсорбции. Для описания взаимодействия применяются разные методы статистической термодинамики для математического моделирования системы. Выбор математического аппарата описания связывания основывается на физической модели адсорбции (в зависимости от того, взаимодействие кооперативное или некооперативное).

Решением системы является определение зависимости концентрации связанного лиганда от общей его концентрации. Форма этой зависимости позволяет выбрать модель адсорбции и предложить методы, наилучшим образом анализирующие экспериментальные данные [235-238].

Анализ данных. Вышесказанное указывает на то, что математическая модель является посредником между теорией и экспериментом, поскольку на основании физической модели адсорбции можно предсказать графическое поведение кривых связывания. Более того, сравнение теоретически рассчитанных данных с помощью математической модели с экспериментально оцененными результатами позволяет более реалистично описать комплексообразование лигандов и ДНК [231].

Необходимо отметить, что физическая модель адсорбции включает также молекулярную модель связывания. С другой стороны, анализ кривых связывания (в целом, термодинамический анализ) позволяет оценить модель в общих свойствах, который и называется решеточной моделью связывания. В этом случае не учитываются отдельные взаимодействия между различными группами матрицы и лиганда, а принимается во внимание длина участка

связывания, энергия взаимодействия. Этот подход применим в случае существования связывания данного лиганда с ДНК несколькими способами, или в случае кооперативного взаимодействия.

В последнем случае необходимо определить не только энергию взаимодействия, но и параметры кооперативности [231]. Модель адсорбции и определение ее параметров выбирается на основании анализа кривых связывания. Однако, если кривая связывания не прямолинейная, такой выбор не может быть однозначным и требует дополнительных данных, математических выкладок.

В случае систем с малым числом частиц существует определенная специфика анализа данных, которая рассмотрена в работах [250-252]. Тем не менее, в настоящее время число моделей адсорбции лигандов с ДНК невелико и основывается на фундаментальных подходах, досканально рассмотренных в работах [235-252]. Во всех этих моделях общим является расчет свободной энергии системы.

Однако для точного описания данных на основании экспериментальных исследований необходим набор теоретических кривых, которые соответствуют разным моделям адсорбции и позволяют определить различные параметры связывания [253-255]. Так, Шварц заложил основу модельного исследования адсорбционных систем, поскольку им показано, что, в зависимости от используемой модели меняются кривые связывания и параметры, которые определяются с их помощью.

4.1.2. Модели связывания лигандов с макромолекулами

В большинстве случаев для описания равновесного связывания лиганда с линейным полимером, как ДНК, используются модели статистической механики, в том числе, модель «одномерной» адсорбции [256- 268].

Адсорбция на линейной молекуле в случае существования парных взаимодействий между связанными молекулами лиганда была рассмотрена еще в пятидесятых годах XX века Стейнером, и были получены формулы, позволяющие описать связывание ионов с полиэлектролитами [256- 268].

Суть модели заключается в следующем: предполагается, что один лиганд (ион) связывается с одним реакционным центром, при этом учитывается взаимодействие между двумя непосредственно соседствующими парами связанных лигандов (эти лиганды занимают ближайшие последовательные реакционные центры на матрице), а также взаимодействие между двумя другими парами лигандов, разделенными от первой пары одним центром связывания.

Т. Хилл разработал другой подход для применения метода статистических сумм к задачам адсорбции и рассмотрел случай связывания нескольких типов лигандов с линейной матрицей. С помощью матричного метода им была построена большая статистическая сумма и получены формулы, которые описывают некоторые случаи (см. [234]):

- когда матрица содержит центры связывания двух разных типов (связывание с гетерополимером);
- когда лиганд «оккупирует» сразу два центра;
- когда рассматривается одновременное связывание двух различных лигандов.

При исследовании связывания одного типа лиганда с ДНК учитывается возможность взаимодействия (или отсутствия такого взаимодействия) между связанными молекулами лиганда, при этом также учитывается размер участка связывания. При рассмотрении ДНК как одномерной матрицы, принимается, что она представляет решетку центров связывания, на котором число заполненных центров составляет размер связывающего участка [231].

Биологически активные вещества (БАВ) различных типов могут связываться с разными реакционными центрами на ДНК, однако могут

существовать центры, являющиеся универсальными, с которыми всегда связывается лиганд одного типа.

В частности, Гурский с соавторами (см. [239]) предложил модель, согласно которой лиганды пептидной природы или содержащие такие группы могут узнавать определенные последовательности пар оснований ДНК и связываться с ними специфически, при котором образуются водородные связи между донорами водорода, амидными группами лиганда и акцепторами этих связей, N3 атомами аденина или O2 атомами тимина и цитозина.

Эти основания в канонической В-форме ДНК занимают положения, связанные спиральной симметрией. Эти атомы также образуют регулярную решетку реакционных центров – акцепторов водородной связи. С этой позиции молекулу дц-ДНК можно представить как две параллельные линейные матрицы, состоящие из центров связывания.

Такая решетка является «двойной», поскольку состоит из двух параллельных линейных цепочек реакционных центров. При этом, если ДНК содержит комплементарные пары (АТ или ГЦ) одного типа, то такие центры будут эквивалентными для связывания лиганда.

Гурский и соавторы показали, что такая схема связывания позволяет реалистически оценить способность регуляторных белков узнавать специфические места связывания среди квазислучайных последовательностей нуклеотидных пар разного типа в ДНК [239].

Именно таким принципом связываются некоторые лиганды, в частности, нетропсин, дистамицин А, Ноеchst 33258 и др., которые содержат пептидные и амидные группы. Эти вещества предпочтительнее связываются в малом желобке ДНК [269,270]. Взаимодействие БАВ с ДНК по указанному принципу обусловлено не только образованием водородных связей, но посредством ван-дер-Ваальсовых и других нековалентных сил.

Предложенный принцип позволил также на примере комплексообразования дистамицина А с ДНК оценить размер участка

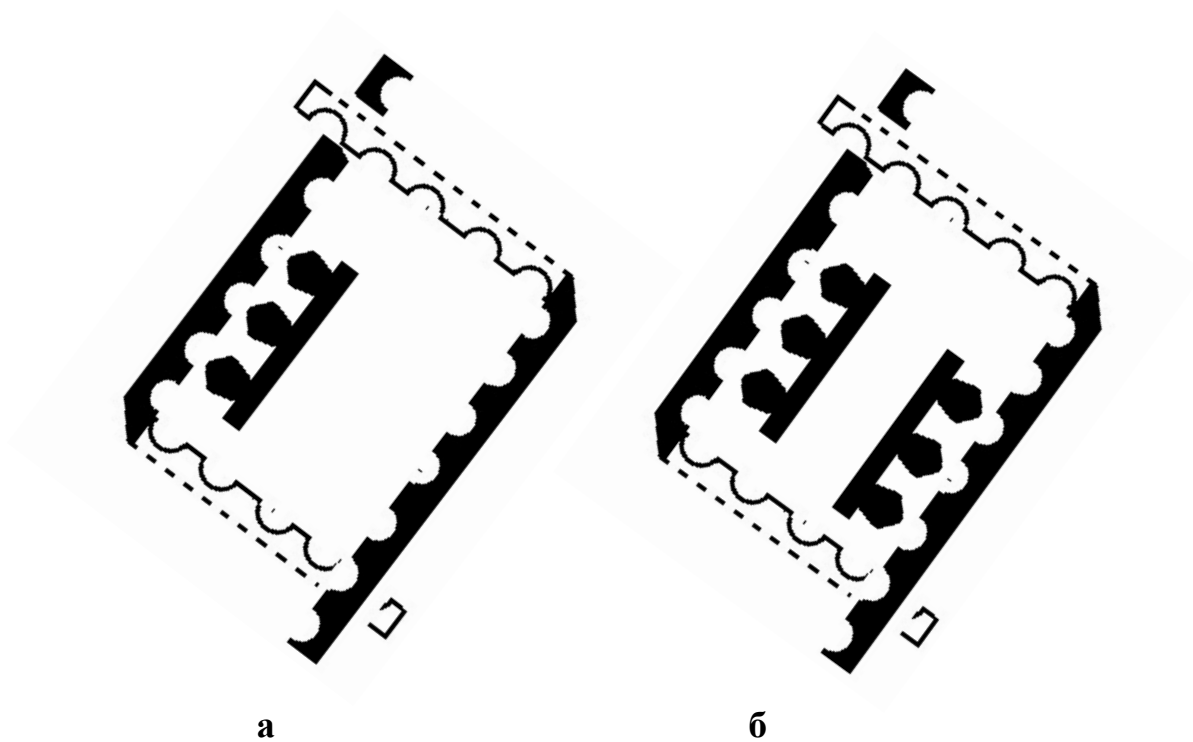


Рис. 36. Схематическое изображение связывания лиганда с двойной решеткой реакционных центров. а. связывание лиганда только на одной половине матрицы; б. связывание двух молекул лиганда на противоположных половинах матрицы [231].

связывания, число реакционных центров, вследствие чего была построена молекулярная модель этого комплекса, которая была подтверждена рентгеноструктурным анализом. Фактически, упрощенная схема связывания на основании параллельной решеточной матрицы позволяет реалистично описать связывание лигандов и анализировать экспериментальные данные [269,270].

В данном случае решетка реакционных центров считается двойной, поскольку сахаро-фосфатный остов дц-ДНК имеет ось симметрии второго порядка, которая перпендикулярна главной оси молекулы. N3 атомами аденина или O2 атомами тимина также имеют ось симметрии второго порядка, вследствие чего состоящие из АТ последовательностей участки ДНК будут иметь двойную решетку реакционных центров.

Если лиганд локализуется в двойных решетках, однако занимает центры связывания только на одной половине матрицы, то в этом случае связывание другой молекулы лиганда на второй половине не будет зависеть от первого, т.е. одновременное связывание двух молекул лиганда будет неконкурентным (рис. 36).

При этом возможно образование так называемой структуры «сэндвич», когда две молекулы лиганда прижаты друг к другу, несмотря на то, что каждая из них связана со своей матрицей (реакционным центром) (рис. 36, б, рис. 37, а). Такая схема связывания лигандов (типа «сэндвич») с ДНК в настоящее время приобретает широкий интерес [231,271].

Тем не менее, если одна молекула лиганда стерически заполняет пространство в малом желобке ДНК, то такая двойная решетка будет похожа на линейную (рис. 37, б). Если же лиганд связывается не с парами оснований, а с сахарофосфатным остовом одной из нитей, независимо от связывания на другой нити, то в этом случае ДНК можно представить как состоящую из двух независимых одномерных решеток (рис. 37, в) [231].

Лиганды могут взаимодействовать и с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами (РНК, оц-ДНК), и такое связывание можно рассмотреть как

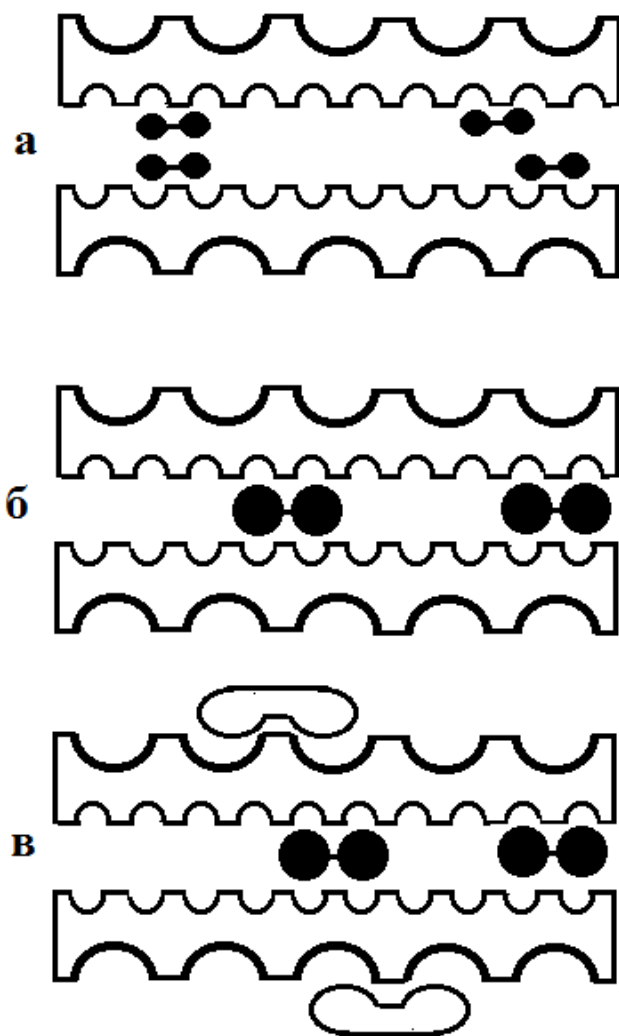


Рис. 37. Схематические изображения конкурентного и неконкурентного связывания лигандов с двойными матрицами. а. двойная матрица, внешняя сторона которой имеет реакционные центры другого размера и типа, чем внутренняя. Если лиганд заполняет центры только на одной половине такой матрицы, то связывание по разным таким половинам будет неконкурентным; б. лиганд заполняет внутренние центры сразу двух половин; в. неконкурентное связывание двух различных лигандов по внутренней и внешней поверхностям матрицы [231].

адсорбцию на линейных одномерных решетках.

4.1.3. Взаимодействие между связанными лигандами

Как уже отмечалось выше, Стейнером было рассмотрено взаимодействие между первыми двумя связанными с матрицей молекулами лиганда. Если лиганд имеет протяженную структуру, то на матрице заполняет несколько центров связывания, вследствие чего эти реакционные центры становятся недоступными для других молекул лиганда.

Стерическое отталкивание между молекулами лиганда не позволяет их одновременное связывание с одними и теми же центрами и этот случай можно рассмотреть как взаимодействие между молекулами лиганда и этому взаимодействию можно приписать потенциал отталкивания, соответствующий «бесконечной» энергии [231].

В дальнейшем стал преобладающим другой подход – взаимодействие между молекулами лиганда стало рассматриваться отдельно от стерического отталкивания [235]. Было рассмотрено взаимодействие между первой парой соседей («ближайшие соседи») и был введен потенциал для этого взаимодействия [235].

При этом, рассматривалось положительное взаимодействие (кооперативное) между соседями, что означало, что связывание первой молекулы лиганда облегчает связывание второго. Однако существуют и другие типы взаимодействий между связанными молекулами лиганда. Одним из таких типов является образование димеров, тримеров и эксимеров более высокого порядка молекул лиганда.

Образование димеров или эксимеров происходит в случае ароматических соединений, которые могут формировать стопки при связывании с матрицей. Возможно также полное или частичное перекрывание реакционных центров лигандом при связывании с дц-ДНК [231].

4.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК

Выше приведенная теория по взаимодействию мультимодальных лигандов с ДНК предсказала возможность связывания БЭ (а также АМД и др. интеркаляторов) с ее различными формами (дц-, оц-) несколькими способами, число которых не ограничено. Анализ экспериментальных данных, полученных для комплексов БЭ-ДНК в рамках указанной теории позволил выявить по крайней мере три способа связывания этого лиганда с дц-ДНК при ионной силе раствора 0.02 М и два способа – с оц-ДНК. При этом, теория также дает возможность количественно рассчитать величины параметров связывания (констант K и числа мест связывания n) БЭ с ДНК этими способами.

Для сравнения теоретически рассчитанных значений K и n с экспериментальными, подходящим является предложенный Скетчардом метод анализа данных по взаимодействию лигандов с макромолекулами (см. Главу 5. Мат. и мет.).

Раствор, содержащий молекулы ДНК и БЭ, рассматривается в термодинамическом равновесии. При этом, НК представляет собой линейную цепочку реакционных центров, состоящих из N звеньев. Уравнение равновесия между свободными и связанными молекулами лиганда можно записать в следующем виде:

$$r = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i C}{1 + K_i C} \quad (4.1)$$

где r – количество связанного лиганда, рассчитанное на нуклеотид;

C – концентрация свободных молекул лиганда;

K_i – константа ассоциации;

n_i – число нуклеотидов, приходящих на одно место связывания;

m – число различных типов комплексов.

При связывании одним способом (4.1) принимает вид:

$$r = \frac{nKC}{1 + KC}, \quad (4.2)$$

которое преобразуется в:

$$\frac{r}{C} = K(n - r) \quad (4.3.)$$

В отложении Скетчарда $r/C=f(r)$ для дц-ДНК дает прямолинейную кривую, пересекающую ось ординат в точке $K \cdot n$ и ось абсцисс в точке n . Однако, в случае многих лигандов эти кривые не прямолинейные, поэтому Крозерс предложил модель «исключенных» мест связывания, согласно которой любая мономерная единица полимера является потенциальным местом связывания (реакционным центром). Однако при адсорбции одной молекулы лиганда на одном из этих центров, находящихся по соседству с обеих сторон этого центра потенциальные места связывания становятся недоступными («исключенными») для других молекул лиганда [272,273]. Вследствие этого графики Скетчарда даже при существовании только одного способа связывания данного лиганда с ДНК становятся непрямолинейными. Учитывая этот факт была получена формула адсорбции лиганда на ДНК в следующем виде [235]:

$$\frac{r}{C} = \frac{K(1 - rn)^n}{(1 - rn + n)^{n-1}} \quad (4.4)$$

где n – длина дц-участка, «занятого» лигандом. Величина n имеет порядок ван-дер-Ваальсового размера адсорбированной молекулы. В (4.4) не учитывается взаимодействие между адсорбированными лигандами.

Численное значение K определяется с помощью касательной, которая пересекает ось ординат в точке $r \rightarrow 0$, а точка пересечения этой касательной с осью абсцисс дает кажущееся число мест связывания ($n_{\text{каж}}$). При максимальном заполнении реакционных центров на дц-ДНК r стремится к своему максимальному значению $r_{\text{max}}=1/n$, которое выражается через $n_{\text{каж}}$ [235].

$$r_{\text{max}}=n_{\text{каж}}(2-1/n) \quad (4.5)$$

Однако, как уже было отмечено выше, данный лиганд может связываться

с ДНК более чем одним способом, при этом, наиболее часто лиганды связываются двумя или более способами (тем более, если они заряжены положительно). В этом случае графики Скетчарда также становятся непрямолинейными. Следовательно, при тех случаях, когда есть дополнительные данные, подтверждающие возможность связывания лиганда более чем одним способом, анализ нелинейных графиков Скетчарда в области низких заполнений разумнее анализировать с этой точки зрения.

В этом аспекте установленным фактом является то, что в случае взаимодействия БЭ с ДНК, нелинейные графики Скетчарда являются результатом существования более одного способа связывания. Этот факт подтвержден множеством экспериментальных исследований различными методами. Однако, непрямолинейными становятся и кривые адсорбции БЭ на ДНК в случае существования более чем двух способов связывания.

В этом случае для экспериментального установления различных способов связывания 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 физических характеристиках образовавшихся комплексов.

Необходимо отметить, что взаимодействие лигандов с ДНК наряду с широкоприменяемыми спектроскопическими (абсорбционной, флуоресцентной, кругового дихроизма (КД) и др.), можно исследовать и электрохимическими методами, в том числе – циклической вольтамперометрии (ЦВ), дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ), квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВ) и др. [249], которые также являются достаточно информативными.

Вследствие того, что спектроскопическими методами взаимодействие лигандов с ДНК исследовано достаточно, ниже приводится краткое описание метода ДИВ, который был применен для изучения связывания БЭ с ДНК.

4.2.1. Исследования комплексов БЭ с ДНК методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии

Спектроскопические исследования комплексообразования лигандов с ДНК основаны на изменениях оптических характеристик реагирующих молекул. В частности, многие лиганды в свободном состоянии оптически неактивные, однако приобретают оптическую активность, когда связываются с макромолекулами, что дает возможность исследования этих комплексов методом кругового дихроизма (КД). Имеет место также изменение флуоресцентных свойств многих соединений при связывании с ДНК. Так, в случае БЭ, АО и др. интеркаляторов интенсивность флуоресценции существенно увеличивается, если эти лиганды интеркалируют в дц-участки ДНК, что дает возможность проводить исследования методом флуоресцентной спектроскопии и количественно рассчитать параметры связывания лигандов с ДНК [221,274-286].

При комплексообразовании лигандов с ДНК меняются не только оптические, но и другие, в частности, электрохимические характеристики этих молекул, поэтому, среди прочих, в настоящее время широкое применение получили вольтамперометрические (циклическая вольтамперометрия – ЦВ, дифференциальная импульсная вольтамперометрия – ДИВ и др.) методы [275-278]. Вольтамперометрическое исследование главным образом основано на том, что связанные с ДНК молекулы лиганда имеют различные по сравнению с несвязанными молекулами электрохимические характеристики, а также отличаются детектируемые количественные параметры (например, сила тока (i), формальный ($E^{0'}$) и ред-окс потенциал (E^0) [276-278].

Определение вольтамперометрическим методом значение константы равновесного связывания низкомолекулярных соединений (в том числе - лекарственных) с ДНК было проведено Ибрахимом (см. [276]) им был развит предложенный Бейером принцип уменьшения коэффициентов диффузии малых

молекул, связанных с биополимерами по сравнению с коэффициентами диффузии свободных молекул [277]. На основе этого, относительно простого подхода при вольтамперометрическом титровании растворов лигандов растворами ДНК создан соответствующий математический аппарат, который позволяет отличить различные способы (интеркаляция, внешнее связывание, кооперативное взаимодействие) связывания лигандов с ДНК и найти численные значения констант связывания различных антибиотиков, природных красителей и иных лекарственных препаратов с нуклеиновыми кислотами.

Таким образом исследован процесс комплексообразования порфиринов, пирромицинона, дауномицина, ногаламицина, актиномицина Д и др. с ДНК [277-279]. Методом же циклической вольтамперометрии (ЦВ) изучен процесс взаимодействия tris-1,10-фенантролин-кобальта (III) с ДНК в водной среде и определена константа связывания электрохимически активного Co(phen)_3^{3+} с фосфатными группами ДНК [277-279]. Методом ЦВ были проведены также исследования по взаимодействию антрациклининового антибиотика дауномицина (ДМ) с ДНК. По величине убывания силы предельного тока ДМ, вследствие связывания с ДНК, можно количественно определить параметры связывания этого лиганда.

С помощью более чувствительных методов дифференциальной импульсной полярографии (ДИП) и дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ) определены параметры связывания ДНК с ногаламицином и ионами Zn(II) , комплексами Co(III) , Ni(II) и Ru(II) с замещенными фенантролиновыми лигандами. Для количественного исследования связывания порфириновых комплексов с ДНК и применения порфиринов для определения ДНК использовались такие электрохимические методы, как линейная *sweep*-вольтамперометрия и хронокулометрия. Взаимодействие БЭ с ДНК исследовалось также методом ЦВ с совмещением гидродинамической вольтамперометрии и амперометрического титрования (см. [277-281] и цит. там).

Так, комплексообразование БЭ с дц-ДНК было зарегистрировано в диапазоне потенциалов от -300 до 1150 мВ с помощью циклической и дифференциальной импульсной вольтамперограмм (рис. 38 и 39). Определен потенциал окисления БЭ в двух растворах с ионными силами 0.02M и 0.154M , который равнялся 730 ± 30 мВ в диапазоне анодных токов.

Характерные пики катодного необратимого восстановления БЭ регистрировались при -616 мВ и -280 мВ. Для дальнейшего вольтамперометрического титрования был выбран пик потенциала $730\pm 30\text{мВ}$, при котором величина предельного тока уменьшалась до таких значений, которые в дальнейшем становятся недетектируемыми (кривая 2 на рис. 38 и кривая 11 на рис. 39). Фактически, при определенных концентрациях БЭ в растворе молекулы БЭ переходят в полностью связанное состояние и больше не проявляют достаточную для детектирования электрохимическую активность.

Разность электрохимической активности связанных и свободных молекул БЭ позволяет на основании данных ДИВ проводить количественный анализ и рассчитать параметры связывания этого лиганда с дц-ДНК, учитывая, что сила тока при потенциале $730\pm 30\text{мВ}$ достаточно чувствительна к низким концентрациям лиганда. Однако, для этого предварительно была получена зависимость предельного тока от концентрации БЭ в интервале от $2,5\cdot 10^{-7}\text{M}$ до $1,3\cdot 10^{-5}\text{M}$, в пределах которого получается линейная зависимость силы тока от концентрации (см. [275]).

При исследовании методом ДИВ соответствующие вольтамперограммы БЭ и его комплексов с дц-ДНК получены в диапазоне потенциала от 300 до 1150мВ , при ионных силах раствора $0,02\text{M}$ и $0,154\text{M}$. По ходу увеличения концентрации ДНК предельный ток уменьшался при пике потенциала 700мВ , соответствующего свободным молекулам БЭ. При этом, имеет место

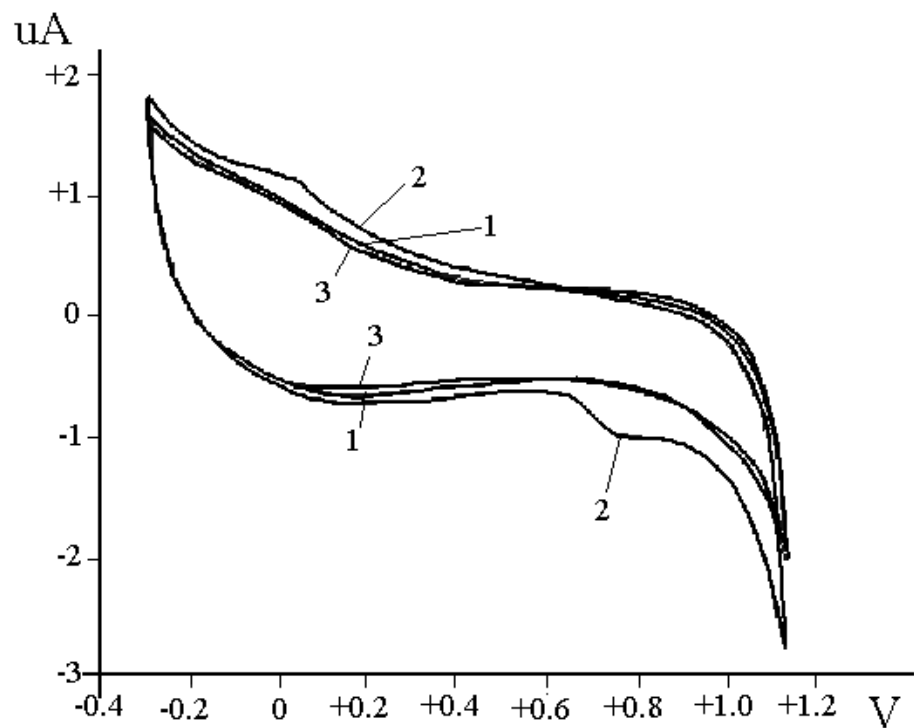


Рис. 38. Циклическая вольтамперограмма $2.77 \cdot 10^{-4}$ М ДНК (1), $3.301 \cdot 10^{-6}$ М БЭ в отсутствие (2) и присутствии $2.774 \cdot 10^{-4}$ М ДНК (3), соответственно. Фоновый электролит – 0.154 М NaCl, скорость сканирования - 100 мВ сек^{-1} , стартовый потенциал - 1150 мВ [275].

небольшой сдвиг пика в сторону более высоких потенциалов. При достаточно высоких концентрациях ДНК практически все молекулы БЭ переходят в связанное состояние, вследствие чего характерный пик потенциала исчезает и величина тока становится неизмеримой.

4.2.2. Определение параметров связывания БЭ с дц-ДНК на основании исследований спектроскопическими и электрохимическим методами

Для определения числа способов связывания БЭ, МС и Н33258 с ДНК сочетались спектроскопические (абсорбционная, флуоресцентная) и электрохимические (ДИВ в случае БЭ, КВВ в случае Н33258) методы. Такой подход позволил выявить различные способы (интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический) связывания БЭ с ДНК с помощью графического анализа экспериментальных данных методом Скетчарда (рис. 40). Совпадающие с ними данные получены нами с помощью метода дифференциальной спектроскопии (ДС) (см. [275,280,281]). Спектроскопические характеристики интеркалированных и свободных молекул БЭ представлены в таблице 1 [282,283].

Как видно на рис. 40, кривые связывания, полученные на основании спектров абсорбции (кривая 1) и флуоресценции (кривая 2) различаются: наклон кривой 2 меньше, чем наклон кривой 1, при этом последняя непрямолинейная (кривая 4 является продолжением кривой 1). Полученная кривая связывания БЭ с дц-ДНК методами ДИВ или ДС также была непрямолинейной и совпадала с кривой 1 на рис. 40. Как уже отмечалось выше, непрямолинейные графики Скетчарда являются результатом или антикооперативного взаимодействия, или же существования способов связывания более одного типа. Для подтверждения одного из этих случаев необходимы дополнительные данные. В этом аспекте теоретические и экспериментальные данные указывают на то, что БЭ и многие другие лиганды с

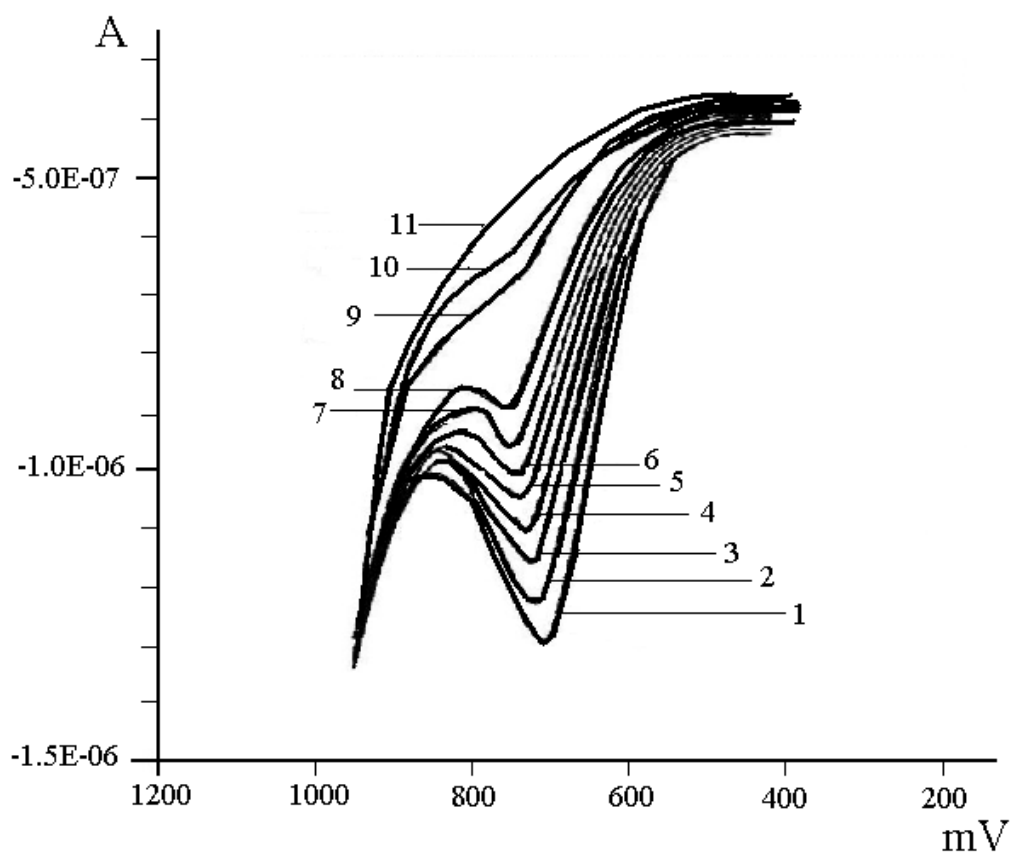


Рис. 39. Дифференциальная импульсная вольтамперограмма $1.162 \cdot 10^{-5}$ М БЭ в отсутствие (1) и присутствии (2) $8.17 \cdot 10^{-6}$ М; (3) $1.218 \cdot 10^{-5}$ М; (4) $1.612 \cdot 10^{-5}$ М; (5) $2.001 \cdot 10^{-5}$ М; (6) $2.390 \cdot 10^{-5}$ М; (7) $2.775 \cdot 10^{-5}$ М; (8) $3.526 \cdot 10^{-5}$ 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 - $\mu=0.02 \text{ М}$ [275].

дц-ДНК связываются более чем одним способом, что позволяет анализировать непрямолинейность графиков Скетчарда с точки зрения существования по крайней мере двух (или больше) способов связывания. С другой стороны, тот факт, что антикооперативность отсутствует, указывает прямолинейность изотермы адсорбции БЭ с дц-ДНК, которая получается на основании анализа результатов флуоресцентных исследований, поскольку кривая 2 прямолинейная и отражает только интеркаляционный способ связывания БЭ с дц-ДНК.

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.

Необходимо отметить, что в области насыщения этих мест связывания, кривая 2 не отклоняется от прямолинейности, что и является подтверждением отсутствия антикооперативности. Поскольку кривые связывания БЭ, полученные абсорбционным и флуориметрическим методами, различаются, то это можно объяснить присутствием связанных с дц-ДНК, но нефлуоресцирующих молекул БЭ. Это отражается на графике Скетчарда, который получен на основании анализа абсорбционных данных. Фактически кривая 1 на рис. 39 отражает сумму всех способов связывания, следовательно, вычитанием кривой 2 из кривой 1, количественно можно оценить величины параметров связывания нефлуоресцирующих комплексов.

Таким образом была получена кривая 3 (рис. 40), которая соответствует нефлуоресцирующим комплексам БЭ с ДНК. Примечательно, что кривая 3 также нелинейная, на основании чего мы заключаем, 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, т.е. адсорбции молекул БЭ на внешней стороне сахарофосфатного остова ДНК (схема в, рис.

Таблица 1.

Спектральные характеристики свободных и интеркалированных в ДНК молекул БЭ [282,283].

Характеристики БЭ	Свободные молекулы БЭ	Связанные молекулы БЭ
максимум поглощения; λ , нм	480	520
максимум флуоресценции; λ , нм	590÷600	590÷600
квантовый выход флуоресценции	~0,007	~0,16
длительность флуоресценции; τ , нс	~1,8	~23
поляризация флуоресценции P, %	~2÷3	~36

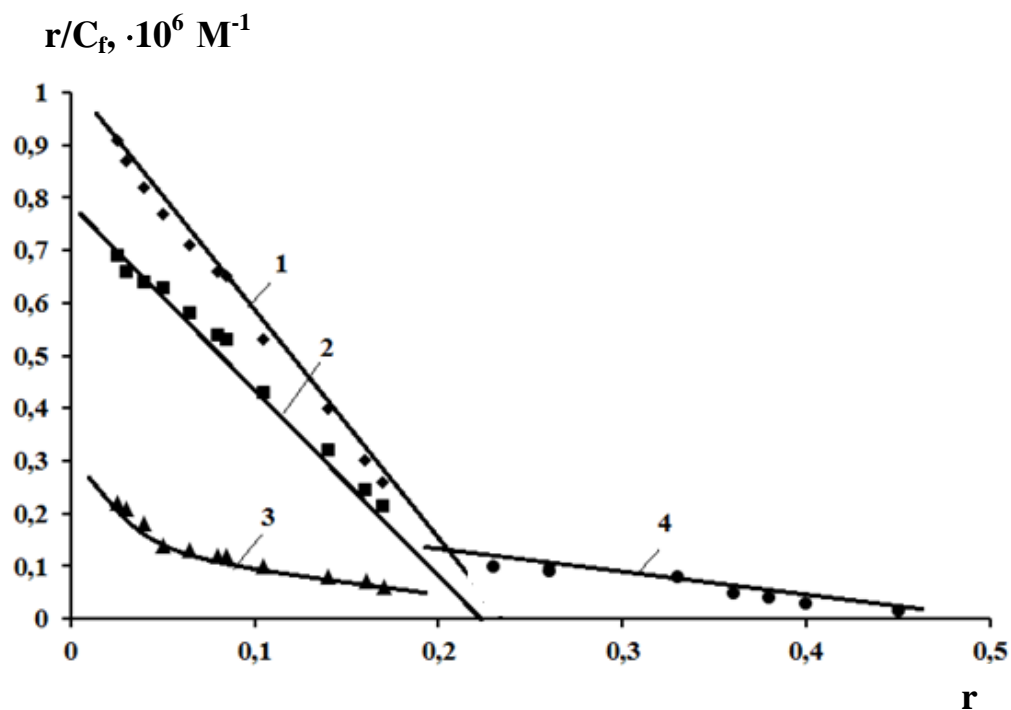


Рис. 40. Изотермы адсорбции БЭ на дц-ДНК в координатах Скетчарда. Кривая 1 получена на основании абсорбционных, кривая 2 - флуоресцентных данных. Эти кривые соответствуют интеркаляционному способу связывания. Кривая 3 получена вычитанием кривой 2 из кривой 1 и соответствует полуинтеркаляционному и более слабому, кривая 4 - электростатическому способам связывания.

37). Для оценки термодинамических параметров связывания (K и n) в настоящее время графики Скетчарда анализируются общепринятыми подходами для кооперативного взаимодействия лиганда с ДНК [237,238,273]:

$$r / C_f = K(1 - nr) \left[\frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right] \left[\frac{1 - (n + 1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2,$$

$$R = \left([1 - (n + 1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr) \right)^{1/2} \quad (4.6)$$

или в случае взаимодействия в рамках модели исключенных мест [237,238,273].

$$r / C_f = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1} \quad (4.7)$$

Для ответа на вопрос о существовании зависимости средства БЭ к определенным последовательностям ДНК нами изучено связывание этого лиганда с синтетическим полинуклеотидом poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], с ДНК *Cl. Perfr.*, тимуса телят (ТТ) и *M. Lysod.* методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Параметры связывания (K и n) БЭ с указанными ДНК приведены в табл. 2-5. Обобщенные в них данные не выявляют заметной зависимости от определенных типов пар оснований при сильном (интеркаляционном) способе связывания. Зависимости r от C_f , полученные для интеркаляционных и полуинтеркаляционных комплексов выявляют, что константы указанных способов связывания БЭ с этими ДНК практически не зависят от среднего GC-содержания последней.

Хорошо известно, что нуклеотидная последовательность обуславливает ширину бороздок ДНК и вклад слабых сил в стабилизацию геометрии и степени гидратированности этих желобков, что, в свою очередь, является определяющим для связывания лиганда в большом или малом желобке ДНК и его специфичности с определенными парами оснований (см. [4]). Тем не менее, значения K интеркаляционных комплексов БЭ с ДНК различного GC содержания практически совпадают друг с другом, совпадают также величины K полуинтеркаляционных комплексов. Движущей силой при интеркаляции

Таблица 2

Значения K и n при интеркаляционном и полуинтеркаляционном способах связывания БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] при ионной силе раствора $2.0 \cdot 10^{-2}$ М, $pH \approx 7.0$.

Способ связывания	$K; M^{-1}$	n (на п.о.)
Интеркаляция	$18,0 \cdot 10^5 \pm 2,0$	6,0
Полуинтеркаляция	$1,8 \cdot 10^5 \pm 0,5$	5,0
Электростатический	$0,17 \cdot 10^5 \pm 0,02$	1,5

Таблица 3

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

Способ связывания	$K; M^{-1}$	n (на п.о.)
Интеркаляция	$18,0 \cdot 10^5 \pm 2,0$	6,0
Полуинтеркаляция	$2,2 \cdot 10^5 \pm 0,5$	5,0
Электростатический	$0,2 \cdot 10^5 \pm 0,02$	1,5

лиганда в ДНК является энтропийный фактор, и основной вклад в этот фактор имеют гидрофобные взаимодействия между ароматическими группами молекул лиганда и азотистых оснований ДНК, независимо от типа оснований (см. [4]), следовательно, для интрекаляции БЭ в плоскость между АТ-АТ, АТ-ГЦ или ГЦ-ГЦ пар практически нет препятствий, единственным условием является 3'-пиримидин-5'-пурин очередность нуклеотидов вдоль спирали ДНК [160,161].

С этой точки зрения разумно полагать, что и в случае полуинтеркаляционного способа связывания БЭ с ДНК специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям не должна проявиться. Иная ситуация обнаружена для другого параметра – n . Как видно из табличных данных, с увеличением ГЦ-содержания ДНК значение n в случае полуинтеркаляционного способа уменьшается, в то время как в случае интеркаляции n не зависит от нуклеотидной последовательности ДНК.

Эта зависимость проявляет монотонное уменьшение от увеличения ГЦ-содержания, что отражает некоторую предпочтительность БЭ к ГЦ парам при полуинтеркаляции, поскольку экстраполяция этой зависимости к ГЦ=100%, значение n приближается к трем нуклеотидным парам на одно место связывания БЭ [217].

Возможным объяснением этого факта может служить то, что АТ последовательности имеют более “жесткую” структуру и более гидратированы, чем ГЦ участки [5]. На это указывают и результаты исследований, где показано, что интеркаляция БЭ в poly(dA)-poly(dT) является кооперативным процессом, в то время как в случае природных ДНК процесс интеркаляции некооперативный. Очевидно, что структурная жесткость и высокая степень гидратированности могут ограничить число мест связывания БЭ в АТ богатых участках [287,288].

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что при интеркаляции в ДНК БЭ не проявляет специфичность к определенным нуклеотидным парам, в то время как при полуинтеркаляционном способе нуклеотидная последовательность играет важную роль при насыщении этих

Таблица 4

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

Способ связывания	$K; M^{-1}$	n (на п.о.)
Интеркаляция	$20,0 \cdot 10^5 \pm 2,0$	6,0
Полуинтеркаляция	$2,5 \cdot 10^5 \pm 0,5$	4,0
Электростатический	$0,2 \cdot 10^5 \pm 0,02$	1,5

Таблица 5

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

Способ связывания	$K; M^{-1}$	n (на п.о.)
Интеркаляция	$20,0 \cdot 10^5 \pm 2,0$	6,0
Полуинтеркаляция	$2,8 \cdot 10^5 \pm 0,5$	3,0
Электростатический	$0,3 \cdot 10^5 \pm 0,02$	1,5

мест связывания, несмотря на то, что константа связывания также не зависит от этого фактора. Известно, что слабый способ соответствует связыванию молекул БЭ с фосфатными остатками ДНК, при этом значение K_w на два порядка меньше, чем значение K_s , соответствующая интеркаляционному способу. K_w зависит от ионной силы раствора и полностью исчезает при $\mu \geq 0.1M$. Поэтому можно полагать, что слабый способ соответствует электростатическому механизму. Более того, слабый способ выявляется как при прямом измерении различными (спектроскопическими, электрохимическими) методами, так и косвенно, при сопоставлении данных, полученных из анализа абсорбционных и флуориметрических исследований.

Разработанная в Главе 2 теоретическая модель выявила возможность связывания мультимодального лиганда не только с дц-, но и с оц-ДНК более чем одним способом и были рассчитаны величины параметров связывания для этих способов. Термодинамические параметры связывания БЭ с одноцепочечной ДНК экспериментально были оценены нами в различных условиях (высокая температура, pH).

Необходимо отметить, что исследование комплексов БЭ с одноцепочечной ДНК при высоких температурах затруднено, поскольку известно, что энтальпия образования двуцепочечных структур, зависящая от температуры плавления T_m , имеет две составляющие - внутреннюю теплоту образования спирали и теплоту связывания или освобождения лигандов с двуцепочечных или одноцепочечных участков [289]. Следовательно, увеличение концентрации лиганда будет приводить к увеличению T_m , если этот лиганд (в данном случае БЭ) предпочтительно связывается с дц-ДНК.

Следовательно, аналогичные исследования требуют выбора условий, позволяющих провести соответствующие эксперименты. Одним из подходов для осуществления таких работ может стать уменьшение ионной силы раствора в случаях, если способы связывания лиганда не зависят от этого фактора, что в случае БЭ вполне оправдывается. Другой подход заключается в применении

синтетических олиго- или полинуклеотидов, имеющих низкую температуру плавления, как например poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]. Однако, для получения достоверных и полноценных данных необходимо провести исследования с природными высокомолекулярными ДНК.

Известно, что дц-ДНК может переходить в оц-состояние под влиянием различных физико-химических факторов, однако, при обращении условий в исходное состояние возможно практически полное восстановление нативного состояния ДНК. Тем не менее, после полной денатурации под влиянием высоких температур, при охлаждении до комнатной температуры ДНК ренатурирует не полностью (10-12 %) [3]. Это замечательное свойство было нами использовано для понижения температуры плавления ДНК и исследования связывания БЭ с ней в оц-состоянии.

Растворы ДНК были подвергнуты воздействию высоких температур (выше температуры, при которой ДНК полностью денатурирует). Затем эта ДНК оставлялась на 48 часов при комнатной температуре и затем была денатурирована методом УФ-плавления, для определения значений температуры, при которых она опять переходила в оц-состояние. В конечном итоге было выявлено, что при ионной силе раствора 0,02 М ДНК ТТ находилась в оц-состоянии ниже 70⁰С, при ионной силе раствора 0,002 М – ниже 65⁰С, поэтому взаимодействие БЭ с оц-ДНК ТТ осуществлялось при 70⁰С.

При исследовании взаимодействия БЭ с ДНК при высоких температурах необходимо учитывать также фактор диссоциации. В работе [118] показано, что в при увеличении температуры до 60⁰С константа связывания БЭ уменьшается в 3 раза и остается неизменной в интервале изменения температуры 60~80 ⁰С. В дальнейшем этот факт был учтен при анализе экспериментальных данных.

Другой подход заключается в выборе условий, при которых температура среды остается неизменной, а в качестве денатурирующего берется иной фактор. В наших экспериментах в качестве такого фактора был выбран рН. Для этого, как уже было выше показано, комплексы ДНК-БЭ были исследованы методом УФ-

денатурации при кислых рН и было выявлено, что при соотношении лиганд/ДНК=1/2 комплексы переходят в полностью оц-состояние при $pH \approx 3,0$.

Исследование комплексов БЭ с ДНК при кислых рН представляет определенный интерес еще и потому, что имеющее при этом место протонирование специфически влияет на структуру биополимера. Известно, что при кислых рН двухцепочечная ДНК денатурирует, однако при определенном соотношении концентраций H^+ и цитозиновых (С) и адениновых (А) остатков наблюдается резкий переход к кислой спиральной форме в богатых этими основаниями участках. Дальнейшее уменьшение рН приводит к дестабилизации этих структур и образованию одноцепочечных спиралей с протонированными основаниями AN^+ и CH^+ [4]. Очевидно, что протонирование оснований приводит к увеличению суммарного положительного заряда, вследствие чего взаимодействие положительно заряженных лигандов становится иным, чем при нейтральных значениях рН. В этом случае необходимо учитывать также значения pK_a лиганда. Для БЭ это значение постоянно при данной ионной силе, и оптические характеристики этого соединения совпадают с таковыми для БЭ при нейтральных значениях рН среды [165].

Учитывая приведенные выше факты, взаимодействие БЭ с синтетическими оц-полинуклеотидами (полученные при денатурации дц-poly(dA)-poly(dT) и дц-poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]) и дц-ДНК различного ГЦ содержания было исследовано нами при температуре $70^\circ C$ и $pH \approx 7,0$ и при $25^\circ C$ и $pH \approx 3,0$ методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Получены кривые связывания БЭ с оц-нуклеиновыми кислотами на основании анализа экспериментальных исследований в координатах Скетчарда для оценки K и n . Кривые, приведенные на рис. 41, непрямолинейные, как и в случае связывания БЭ с дц-ДНК и, несмотря на то, что получены при различных условиях, практически совпадают друг с другом.

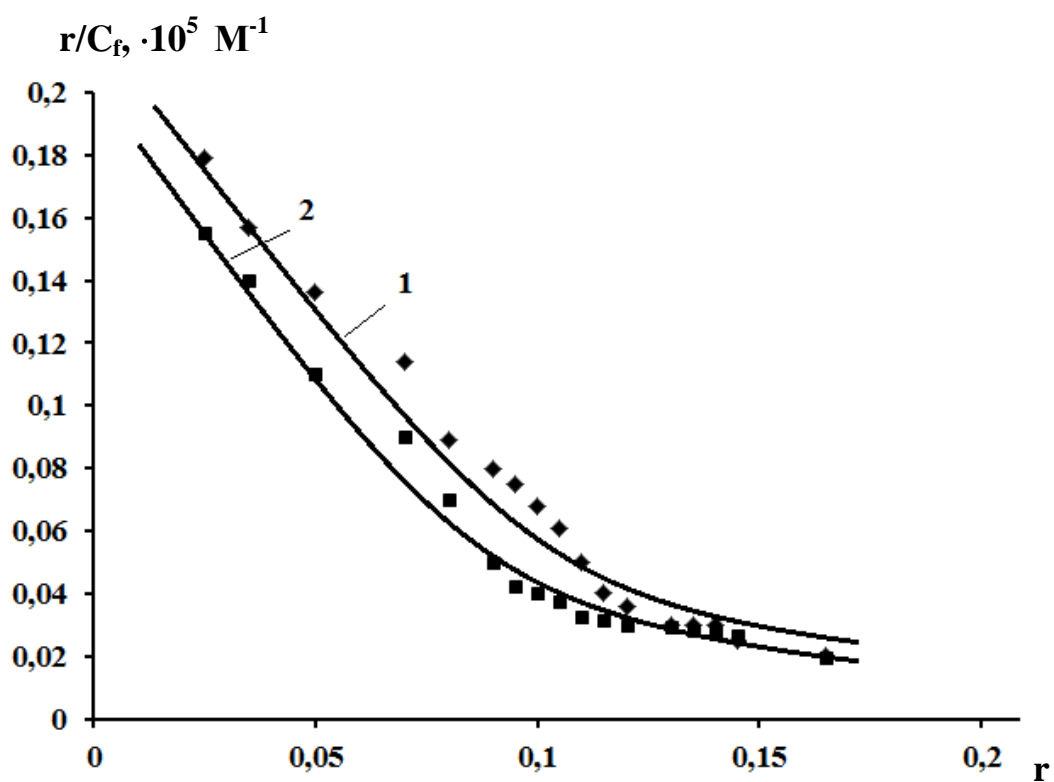


Рис. 41. Изотермы адсорбции БЭ на оц-полинуклеотиде (1) и оц-ДНК (2) в координатах Скетчарда. Кривая 1 получена при 70⁰С и рН≈7,0, кривая 2 – при 25⁰С и рН≈3,0; ионная сила раствора – 0,02.М.

Таблица 6

Значения K и n при полуинтеркаляционном и электростатическом способах связывания БЭ с оц-poly[d(A-T)] при различных ионных силах раствора

Ионная сила раствора	$K; M^{-1}$		n (на основании)	
	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ
0,002 М	$1,3 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,30 \cdot 10^5 \pm 0,02$	3,0	1,3
0,01 М	$1,2 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,25 \cdot 10^5 \pm 0,02$	3,0	1,3
0,02 М	$1,1 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,23 \cdot 10^5 \pm 0,02$	3,0	1,3

Таблица 7

Значения K и n при полуинтеркаляционном и электростатическом способах связывания БЭ с оц-ДНК Cl. Perfr. при различных ионных силах раствора

Ионная сила раствора	$K; M^{-1}$		n (на основании)	
	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ
0,002 М	$1,3 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,28 \cdot 10^5 \pm 0,05$	2,0	1,4
0,01 М	$1,2 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,22 \cdot 10^5 \pm 0,05$	2,0	1,3
0,02 М	$1,1 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,17 \cdot 10^5 \pm 0,05$	2,0	1,3

Ранее взаимодействие БЭ и других интеркаляторов с оц-нуклеиновыми кислотами рассматривалось с точки зрения существования дц-участков в них (см. [159] и цит. там), вследствие чего считалось, что эти лиганды интеркалируют только в дц-участки этих НК или связываются электростатически, с их фосфатными группами. В этих исследованиях не принимался во внимание тот факт, что возможна частичная интеркаляция ароматических лигандов в плоскость между парами оснований оц-НК. Однако теоретический анализ, приведенный в Главе 2, предсказывал существование связывания мультимодальных лигандов с оц-ДНК неэлектростатическими способами. На основании этого, анализ кривых связывания в координатах Скэтчарда проводили с учетом существования, по крайней мере, двух способов связывания, в результате которого наблюдается удовлетворительное соответствие между теорией и экспериментом. Примечательным является то, что и другие группы исследователей экспериментальным путем выявили, что БЭ, а также АМД с оц-полинуклеотидами могут связываться несколькими способами, при этом один из них соответствует интеркаляционному механизму, что дало веское основание называть этот способ полуинтеркаляцией [218,290,291].

С помощью уравнения (4.9) из графиков Скэтчарда (рис. 41) рассчитаны значения K и n для, по крайней мере, двух способов связывания, и проведено сравнение полученных данных с теоретическими. Учитывая долю связанных различными способами молекул БЭ с оц-полинуклеотидами были получены следующие значения: $K_1 \approx 2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $n_1 \approx 2,0$ $K_2 \approx 5,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_2 \approx 4,0$, $p = 0,35$. С учетом того, что полученные значения констант связывания БЭ с одноцепочечной ДНК отличаются на порядок, один из способов можно считать «сильным», а другой «слабым». Эти данные находятся в хорошем соответствии с экспериментальными, полученными для комплексов БЭ с оц-poly[d(A-T)] и оц-ДНК Cl. Perfr., тимуса теленка (ТТ) и M. Lysod. Значения параметров связывания БЭ с указанными полинуклеотидом и ДНК обобщены в таблицах

Таблица 8

Значения K и n при полуинтеркаляционном и электростатическом способах связывания БЭ с оц-ДНК Т.Т. при различных ионных силах раствора

Ионная сила раствора	$K; M^{-1}$		n (на основании)	
	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ
0,002 M	$1,5 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,15 \cdot 10^5 \pm 0,05$	3,0	1,3
0,01 M	$1,4 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,10 \cdot 10^5 \pm 0,05$	3,0	1,3
0,02 M	$1,2 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,07 \cdot 10^5 \pm 0,05$	2,0	1,2

Таблица 9

Значения K и n при полуинтеркаляционном и электростатическом способах связывания БЭ с оц-ДНК М. lisd. при различных ионных силах раствора

Ионная сила раствора	$K; M^{-1}$		n (на основании)	
	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ	Полуинтеркаляционный способ	Электростатический способ
0,002 M	$1,3 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$0,15 \cdot 10^5 \pm 0,05$	3,0	1,3
0,01 M	-	-	-	-
0,02 M	-	-	-	-

6-9. Один из важных результатов проведенных теоретических и экспериментальных исследований заключается в том, что как в случае дц-, так и оц-ДНК получаются хорошо согласующиеся данные для полуинтеркаляционного способа связывания. Точная оценка константы связывания лиганда с ДНК позволяет определить величину изменения свободной энергии, а также энтальпии и энтропии по уравнениям (2.2) и (2.3). Полученные данные при интеркаляционном способе связывания БЭ с ДНК обобщены в таблице 10. Приведенные данные выявляют, что интеркаляция в основном имеет энтальпийную природу, поскольку изменение энтропии незначительное, в то время как изменение энтальпии существенно и находится в хорошем соответствии с данными работы [38].

Для полуинтеркаляционных комплексов аналогичные данные получены в работе [291], где получены комплексы БЭ с несамокомплементарными тетрадезоксинуклеотидами 5'-d(CGAA) и 5'-d(AAGC). Результаты этой работы выявляют, что значение $\Delta G \sim -6$ ккал/моль, в то время как $\Delta H \sim -20,5$ ккал/моль, $\Delta S \sim 50$ кал/К·моль. Очевидно, что значения ΔH и ΔS намного больше таковых, оцененных для интеркаляционных комплексов БЭ с ДНК. Это различие может быть обусловлено некоторыми причинами, однако очевидно, что полуинтеркаляционный способ связывания также имеет энтальпийную природу. С другой стороны, комплексообразование БЭ с оц-ДНК имеет также энтропийную природу, что обусловлено более разупорядоченной структурой оц-НК по сравнению с дц-ДНК. Однако, тот факт, что значение ΔS в случае комплексов БЭ с оц-полинуклеотидами примерно вдвое больше, чем в случае дц-НК, является хорошим показателем стабильности полуинтеркаляционных комплексов БЭ с дц- и оц-ДНК.

Таким образом, экспериментальные данные в совокупности с теоретическими выводами позволяют заключить, что классический интеркалятор БЭ проявляет мультимодальность и связывается с дц-ДНК интеркаляционным, полуинтеркаляционным (по типу «сэндвич» [231]) и электростатическим

способами. Более того, являясь стабилизатором (скрепкой) дц-структуры ДНК, БЭ связывается и с ее оц-формой и образует по крайней мере два типа комплексов – полуинтеркаляционный и электростатический.

Таблица 10

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

T, °C	K, $10^5 M^{-1}$	n	ΔG , ккал/моль	ΔH , ккал/моль	ΔS , кал/К·моль
дц-ДНК					
20	$20,0 \pm 0,5$	6	$-(8 \div 9) \pm 0,5$	$-5 \pm 0,5$	$31,8 \pm 0,5$
40	$15,0 \pm 0,5$	6	$-(8 \div 9) \pm 0,5$	$-5 \pm 0,5$	$29,5 \pm 0,5$
50	$10 \pm 0,5$	6	$-(8 \div 9) \pm 0,5$	$-5 \pm 0,5$	$27,3 \pm 0,5$
оц-ДНК					
70	$1,0 \pm 0,5$	2	$-(9 \div 10) \pm 0,5$	-	-

4.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИНТЕРКАЛЯТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО С ДНК

Результаты плавления комплексов ДНК с МС и их сопоставление с данными теории МСЛ указывают, что этот лиганд также может проявлять мультимодальность при взаимодействии с различными формами ДНК, однако проявление того или иного способа связывания МС зависит от ионной силы раствора. Благодаря планарной структуре, МС связывается с ДНК интеркаляционным механизмом. В большинстве работ этот факт не стал предметом дискуссии, однако, приведенные нами выше экспериментальные данные ставят под сомнение обязательное проявление 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 не полностью проливают свет на эти вопросы [14-17]. С другой стороны, полученные нами, а также литературные данные указывают на существование по крайней мере двух способов связывания, один из которых – электростатический [14-17]. С этой точки зрения, для более точного выяснения механизмов связывания, нами исследовалось комплексообразование МС с дц-ДНК спектроскопическими методами. Полученные результаты вместе с данными по плавлению этих комплексов позволяют уточнить некоторые вопросы о механизмах связывания. С этой точки зрения необходимо отметить, что МС обладает одной особенностью, что присуща не всем интеркаляторам: этот лиганд поглощает свет в длинноволновой области и флуоресцирует, при этом, его флуоресценция регистрируется в этой же области (от 500 до примерно 800 нм) (рис. 42). Этот факт можно объяснить тем, что энергия возбуждения, когда электроны возвращаются в невозбужденное стационарное состояние, излучается в виде света с небольшими потерями. При этом, если возбуждение проводится при

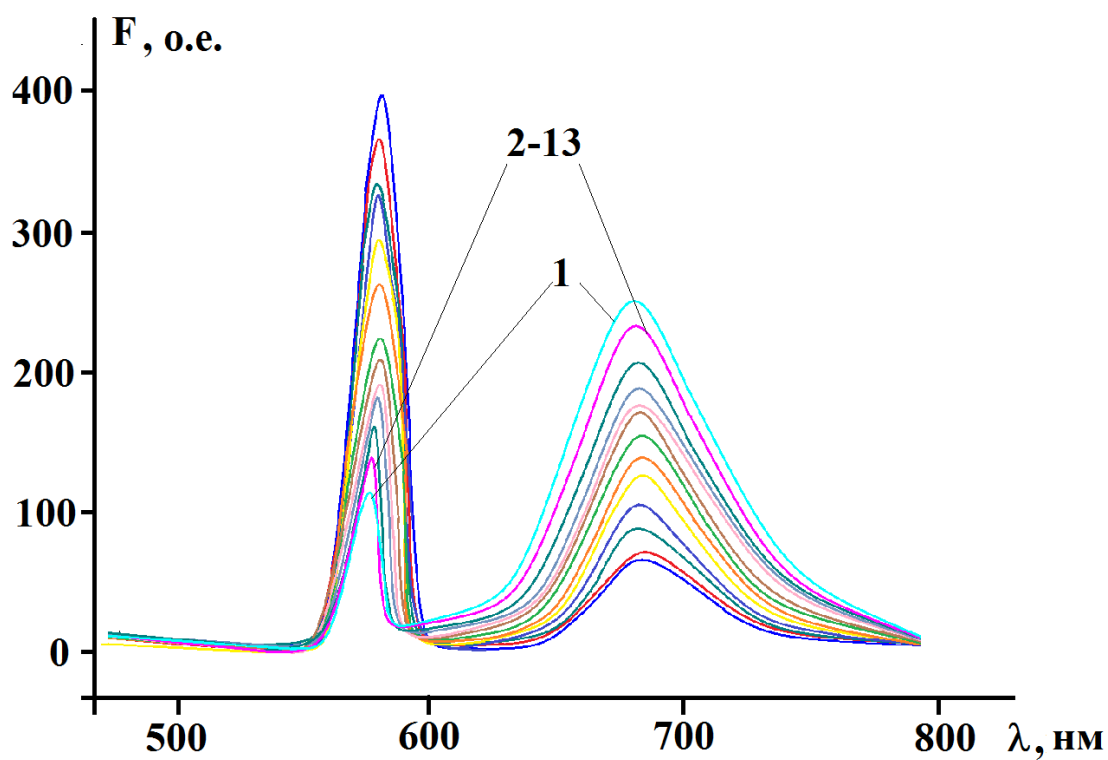


Рис. 42. Спектры флуоресценции МС (1) и МС-ДНК комплексов (2-13) в интервале изменения r ($r = \text{ДНК/МС}$) - $0 \leq r \leq 20.0$ при $\text{pH} = 7.0$, $t = 25^\circ\text{C}$, $\mu = 2.0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ [292]. $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 583$ и $\lambda_{\text{em}} = 682 \text{ nm}$.

290 нм (максимум поглощения МС в УФ области), на спектрах флуоресценции образуются два пика в интервале длины волны $300 \leq \lambda \leq 800$ нм.

Обычно принято возбуждение проводить при наиболее близких к самому длинноволновому пику испускания длинах волн, (см. [220]). Так, если МС возбуждается при длинах волн его поглощения в видимой области ($\lambda=668$ нм), то максимум флуоресценции проявляется при 682 нм. В указанном интервале изменения λ (600~800 нм) имеет место тушение флуоресценции при связывании МС с дц-ДНК. Объяснить эту аномалию с точки зрения интеркаляции невозможно, поскольку в случае других катионных интеркаляторов (БЭ, АО, ПФ) такой эффект не наблюдается. Более того, по сравнению с указанными интеркаляторами, интенсивность флуоресценции МС в водной среде значительно выше в свободном состоянии. Этот эффект также находится в несоответствии с теорией флуоресценции (см. [221]), а также с аналогичными данными, полученными для комплексов дц-ДНК с указанными интеркаляторами [275,293,294]. Исходя из этого, 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. Из полученных спектров выявилось, что, по мере увеличения концентрации дц-ДНК в растворе, пики при 583 нм возрастают, что соответствует эффекту, обнаруженному для случая других интеркаляторов.

Необходимо отметить, что обычно спектры флуоресценции многоатомных органических соединений однополосные, поскольку у них существует набор энергетически близких электронных орбиталей в возбужденном состоянии и энергия возбуждения распределяется между этими орбиталями, а излучение в виде света происходит из самой нижней возбужденной

орбитали, обуславливающий одну относительно широкую полосу испускания [221].

В случае структурного аналога МС акридинового оранжевого (который отличается от МС отсутствием атома серы в сердцевине акридиновой группы) аналогичный эффект не обнаруживается. Следовательно, спектр флуоресценции МС является отражением особенности структуры этого красителя.

Проявление двух или больше полос испускания в спектрах флуоресценции органических соединений может быть результатом также процесса эксимеризации, когда ароматические молекулы образуют стопкообразные ассоциации в растворе. Однако в этом случае образуются пики, которые сдвинуты в сторону более длинных волн по сравнению с основным пиком и имеют намного слабую интенсивность [221]. Такие пики в спектрах флуоресценции МС и его комплексов с ДНК не проявляются, поскольку процесс эксимеризации в случае МС осуществляется при больших концентрациях лиганда ($C > 10^{-4}$ М/л) в отсутствие или присутствии матрицы (например, ДНК). При выбранных нами концентрациях МС ($\sim 10^{-6}$ моль на литр) димеризация или эксимеризация не обнаружена, поскольку длинноволновые низкоинтенсивные пики отсутствуют. С этой точки зрения, обусловленные структурой лиганда флуоресцентные свойства могут быть информативными при оценке способов связывания МС с дц-ДНК.

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 (вода, растворенный в ней кислород). Одним из наиболее доступных и достаточно простых подходов измерения тушения является метод Штерна-Волмера (см. [220]):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [\text{ДНК}] \quad (4.10)$$

где F_0 и F – интенсивности флуоресценции МС в отсутствие и присутствии тушителя ДНК, K_{sv} – константа тушения Штерна-Волмера. По этой формуле рассчитывалось значение $K_{sv}=4.2 \cdot 10^4$ Л/моль. Сравнение значения K_{sv} с аналогичной величиной, полученной при взаимодействии МС с оц-ДНК выявляет, что эти величины отличаются друг от друга примерно в два раза (см. [196]). Этот экспериментально полученный результат не может быть следствием интеркаляции МС в дц-ДНК. С другой стороны, увеличение интенсивности флуоресценции при 583 нм по мере увеличения концентрации ДНК в растворе указывает на интеркаляционный механизм связывания. Сопоставляя эти данные мы заключаем, что МС связывается с ДНК полуинтеркаляционным способом. Эти данные хорошо согласуются с результатами плавления комплексов ДНК-МС при ионной силе раствора 0,02 М. Полуинтеркаляционный способ связывания отражается также на абсорбционных свойствах комплексов дц-ДНК-МС, поскольку длинноволновый сдвиг максимумов комплексов в этом случае небольшое (см. [222,292]).

Параметры связывания МС с дц-ДНК получены на основании анализа спектроскопических данных. Изотерма адсорбции Скотчарда, описывающая взаимодействие, непрямолинейная (рис. 43). Эта изотерма получена в [222,292] и приводится для наглядности: отложенные на изотерме связывания экспериментальные точки получены из анализа флуориметрических и абсорбционных данных и совпадают друг с другом, вследствие чего приведена усредненная кривая. На этом графике четко образуются два прямолинейных участка, проявление которых обусловлено двумя способами связывания МС с ДНК. Значения K и n характеризуют сродство МС с ДНК и указывают на то, что один из способов является более сильным, второй - более слабым. Эти значения обобщены в таблице 11.

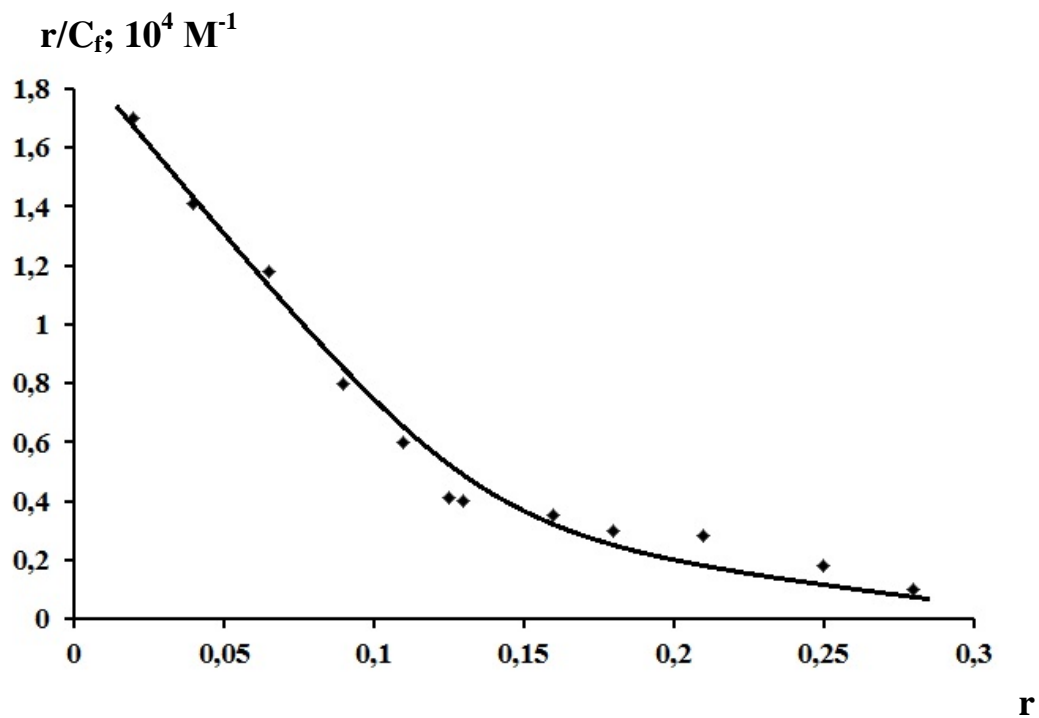


Рис. 43. Кривая связывания МС с ДНК в координатах Скетчарда, полученная из спектров флуоресценции и поглощения, при рН=7.0, t=25 °С, $\mu=2 \cdot 10^{-2}$ М [292].

Сравнение оценок параметров K и n , рассчитанные с помощью теории МСЛ и полученные экспериментально выявляет хорошее соответствие в том 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 в том случае, если принимается, что сильный способ связывания МС с дц-ДНК осуществляется вследствие полуинтеркаляции, но не интеркаляции, второй способ – электростатического взаимодействия [292].

Аналогичные исследования при ионной силе раствора $0,002$ М выявили по крайней три способа связывания – интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический, для которых определены значения K и n . Значения параметров связывания МС с ДНК Т.Т. обобщены в таблице 11. Из табличных данных выявляется, что в случае МС также обнаруживается хорошее соответствие между теоретическими и экспериментальными величинами параметров связывания этого лиганда с ДНК. Более того, эти данные объясняют и результаты плавления тройной системы БЭ-ДНК-МС при ионной силе раствора 0.002 М.

Так, изменение ширины интервала плавления этой системы, как было показано, колоколообразное, однако достигает нулевого значения при меньших концентрациях лигандов, поскольку и БЭ, и МС связываются с ДНК одинаковыми способами, при этом, их сродство с ней также практически одинаковое (такая же ситуация обнаружена в случае БЭ и АМД при ионной силе раствора 0.02 М (см. [118])).

Этот факт указывает на то, что при совместном взаимодействии обоих лигандов центры связывания на ДНК указанными способами заполняются независимо друг от друга при низких концентрациях, однако при дальнейшем увеличении концентраций этих лигандов, когда эти места насыщены, вытеснение связанных молекул одного из лигандов другим не произойдет, что и наблюдается экспериментально.

Значения K и n при полуинтеркаляционном и электростатическом способах связывания МС с ДНК Т.Т. при различных ионных силах раствора

Способ связывания	$K; M^{-1}$		n (на основании)	
	0,002 М	0,02 М	0,002 М	0,02 М
Интеркаляционный	$15 \cdot 10^6 M^{-1} \pm 0,5$	-	5,0÷6,0	-
Полуинтеркаляционный	$7,5 \cdot 10^5 \pm 0,5$	$6,5 \cdot 10^5 \pm 0,5$	2,0÷3,0	4,0
Электростатический	$0,20 \cdot 10^5 \pm 0,05$	$0,15 \cdot 10^5 \pm 0,05$	1,5	2

Таким образом, на основании полученных результатов мы заключаем:

- при взаимодействии МС с ДНК при различных условиях среды полуинтеркаляционный способ можно считать универсальным;
- ионная сила раствора является тем фактором среды, которая может явиться движущей силой для проявления (или угнетения проявления) интеркаляционного способа связывания МС с дц-ДНК;
- МС, являясь акридиновым красителем, проявляет необычные спектральные свойства – имеет два пика флуоресценции, один из которых уменьшается по мере увеличения доли связанных с дц-ДНК молекул, а также имеет место небольшой сдвиг в длинноволновую область спектров поглощения при связывании с дц-ДНК;
- значение константы тушения (K_{SV}) при связывании МС с дц-ДНК при ионной силе раствора 0,02 М, всего в два раза превышает значение, соответствующее комплексам оц-ДНК-МС, что также указывает на отсутствие полной интеркаляции в этих условиях;
- при ионной силе раствора $I \geq 0,02$ М МС связывается с дц-ДНК двумя – сильным полуинтеркаляционным и более слабым электростатическим способами;
- при ионной силе раствора 0,002 М основным способом связывания МС с ДНК становится интеркаляция, однако, наряду с этим способом, МС взаимодействует с ней также полуинтеркаляционным и электростатическим способами;
- теоретическая модель 1 позволяет из низкомолекулярных соединений, непосредственно связывающихся с ДНК, выделить мультимодальные лиганды в отдельную подгруппу.

4.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕИНТЕРКАЛЯТОРА НОЕСНСТ 33258 С ДНК

Вышеприведенные данные, полученные для комплексов ДНК с классическим моноинтеркалятором БЭ и неклассическим моноинтеркалятором МС находятся в хорошем соответствии с теории МСЛ. Эта модель 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 получается в случае лигандов-моноинтеркаляторов. С этой точки зрения, границы применения данной теории к лигандам можно определить в том случае, если получены экспериментальные данные по взаимодействию не интеркаляторов с ДНК и анализированы с помощью этой теории. Очевидно, что в случае соответствия между экспериментом и теорией, последняя приобретет более широкое применение. Основываясь на этом, в данной работе приводятся данные также по комплексообразованию классического желобково связывающегося лиганда Н33258 с ДНК. Этот лиганд содержит два бис-бензимидазных, а также одну фенольную и одну пиперазиновую группы, имеет серповидную форму и связывается с ДНК по принципу «ключ к замку», поскольку его пространственная структура находится в геометрическом соответствии с ее малым желобком [179-188]. Этот лиганд также является представителем семейства АТ специфически связывающихся в малом желобке ДНК соединений и характеризуется высокой константой связывания $\sim 10^7 \div 10^8$ М⁻¹. Однако, не со всеми последовательностями (АТ)_n этот лиганд проявляет высокое сродство: с АААА или ААТТ сродство более высокое, чем с ТТАА или ТАТА, поскольку эти последовательности имеют различные геометрические параметры [294].

Тем не менее, несмотря на то, что этот лиганд является типичным представителем желобково связывающихся лигандов, может с ДНК связываться также интеркаляционным механизмом с более низкой константой связывания, проявляя специфичность к ГЦ богатым участкам [189-194].

Предпочтительность Н33258 к малому желобку и его специфичность к АТ парам в этом желобке обусловлены не только геометрическими особенностями взаимодействующих молекул, но и некоторыми другими особенностями малого желобка. Этот желобок ДНК является более гидрофобным и узким, имеет высокий электроотрицательный потенциал, в нем вода образует более упорядоченный «мостик», «сшивая» края этого желобка [5]. Вследствие этого, катионный лиганд Н33258 проникает в этот желобок ДНК и вступает во взаимодействие с его стенками за счет ван-дер-Ваальсовых сил, при этом, с О2 атомами тимина и N3 атомами аденина образует водородные связи, что стабилизирует образовавшиеся комплексы [182,183].

Кроме специфического желобкового или интеркаляционного, Н33258 связывается и с внешней стороны ДНК неспецифически с фосфатными группами последней, за счет электростатических сил [189-194]. Необходимо отметить, что локализация молекул лигандов в малом желобке ДНК не вызывает заметных структурных изменений в ней, как в случае интеркаляции. Одна молекула желобково специфического лиганда охватывает 5-6 пар оснований вдоль цепи ДНК, при этом эти участки становятся более «жесткими», в то время как соседние с ними участки остаются гибкими [164, 189-194]. Очевидно, что одним из главных факторов, обуславливающих специфическое связывание Н33258 с ДНК, является ионная сила раствора, поскольку в зависимости от этого фактора степень гидратированности ДНК меняется [4,164], что и должно влиять на сродство Н33258 к ДНК. На это указывают и приведенные выше результаты УФ-плавления комплексов Н33258-ДНК, полученные при различных ионных силах.

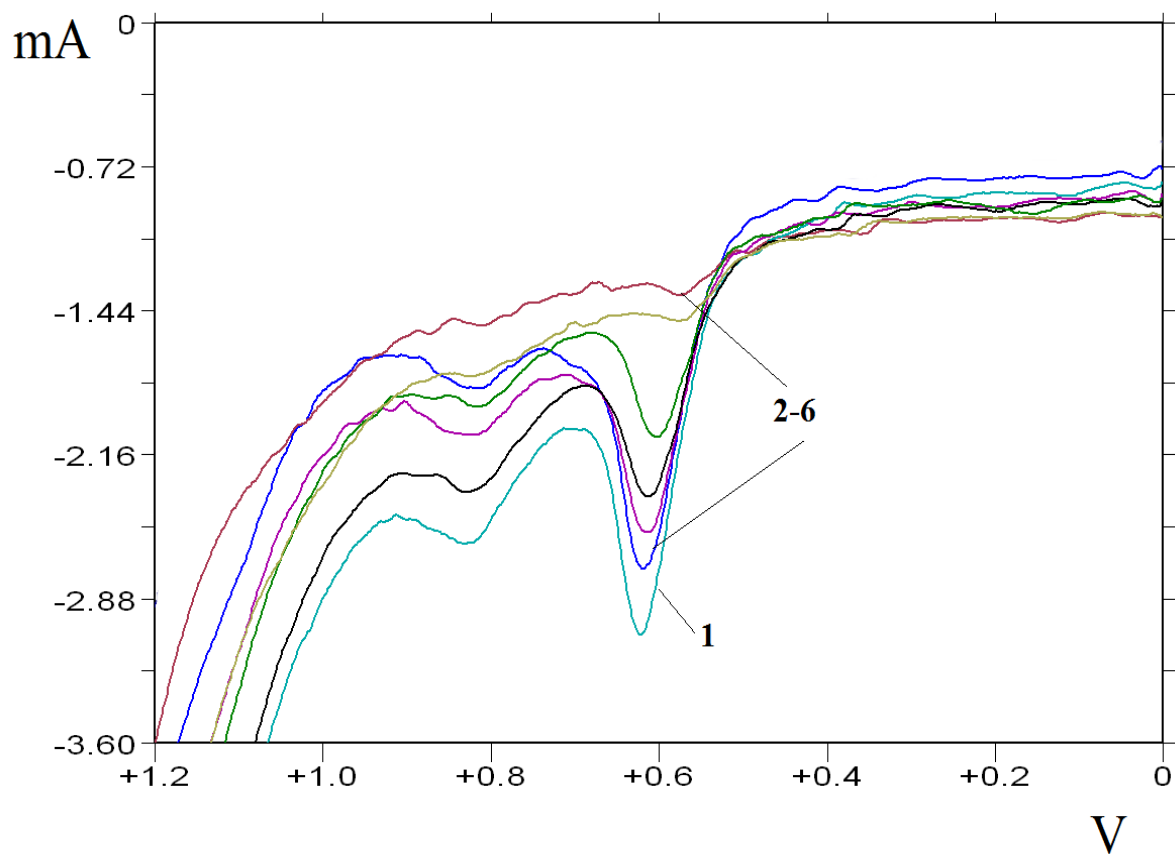


Рис. 44. Квадратно-волновая вольтаммограмма H33258 в отсутствие (1) и присутствии ДНК. Концентрация H33258 в растворе - $C=4,0 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация ДНК варьировала от $1,41 \cdot 10^{-6}$ до $1,2 \cdot 10^{-4}$ М. Ионная сила раствора - $\mu=0,02$ М.

Для оценки параметров связывания K и n взаимодействие Н33258 с ДНК исследовалось при ионных силах раствора 0,002; 0,004; 0,01 и 0,02 М методами квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВ), а также абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Как и в случае комплексообразования МС с ДНК, при взаимодействии Н33258 с ней, при низких заполнениях (в области малых значений Γ , соответствующих сильному (специфическому) типу связывания), изотермы адсорбции в координатах Скетчарда, полученные на основании анализа спектров флуоресценции и поглощения, а также квадратно-волновых вольтамперограмм (рис. 44), совпадают друг с другом, что указывает на отсутствие еще одного, скрытого способа связывания. Однако, изотермы адсорбции, представленные на рис. 45, непрямолинейные, как и ожидалось, что объясняется проявлением сильного и слабого типов взаимодействий.

Из графиков Скетчарда комплексов Н33258-ДНК выявляется согласующаяся с данными плавления особенность: ионная сила раствора существенно влияет на сродство этого лиганда к НК.

Существующие литературные данные в основном относятся к структурным организациям этих комплексов в условиях, при которых проявляется АТ специфичность, однако влияние ионной силы раствора на комплексообразование оставалось в стороне, в то время как полученные нами данные выявляют существенную роль этого фактора на взаимодействие Н33258 с ДНК. Можно полагать, что ионная сила 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 графиков Скетчарда вычислены значения K и n и представлены в табл. 12. Из табличных данных становится очевидно, что значение K_s , полученное при ионной силе раствора 0,02 М, на порядок 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. Близкие значения K_s получены при ионных силах раствора 0,002 и 0,01 М, однако этот эффект не

Таблица 12.

Зависимость значений K 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	$7.90 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,5$	5,5	3,0
0,004	$0,60 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,05$	4,0	3,3
0,010	$9,50 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,05$	5,5	3,5
0,020	$55.0 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,05$	6,0	3,6

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

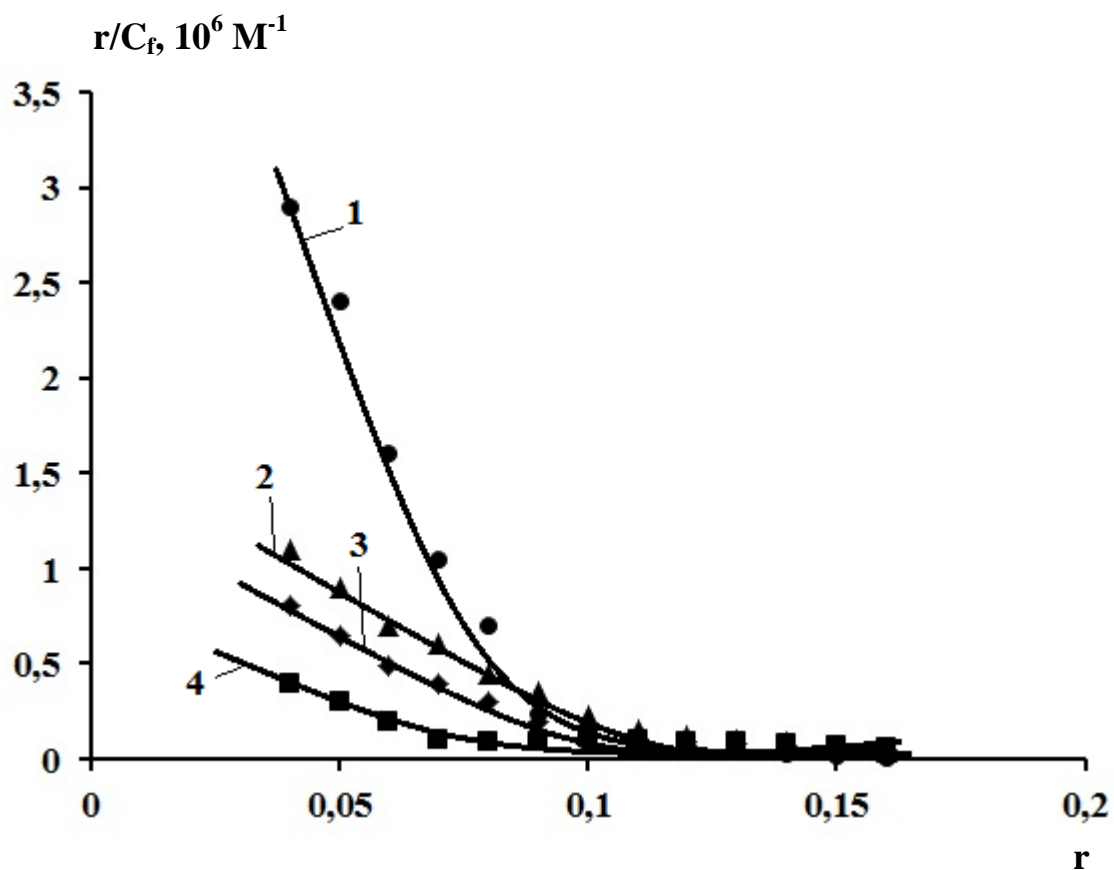


Рис. 45. Изотермы адсорбции Hoechst 33258 с ДНК в координатах Скетчарда. Кривая 1 получена при ионной силе раствора 0,02; кривая 2 – 0,01; кривая 3 – 0,04; кривая 4 – 0,002 М, рН=7.0, $t=25^\circ\text{C}$, $\mu=2 \cdot 10^{-2}$ М.

может стать критерием одинакового механизма связывания НЗ3258 с ДНК, поскольку результаты плавления комплексов при этих же значениях ионной силы раствора выявили качественное различие: при ионной силе 0,002 М АТ специфичность не проявляется, при 0,01 М – основным способом связывания является такая специфичность. Повышение ионной силы раствора вдвое приводит к резкому увеличению величины K_s . Возможно, существует критическое значение ионной силы раствора, выше которого степень сродства НЗ3258 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 НЗ3258 уменьшены. С другой стороны, в этих условиях должен увеличиться и реальный объем молекул лиганда вследствие увеличения гидратной оболочки. Повышение ионной силы раствора приводит к изменению степени гидратированности растворенных молекул лиганда, при этом, начиная с определенных величин этого фактора, указанные молекулярные свойства ДНК и лигандов должны оставаться постоянными. Необходимо отметить, что и в случае БЭ обнаруживается определенное влияние ионной силы раствора на параметры связывания этого лиганда с дц-ДНК, в то время как на взаимодействие БЭ с оц-ДНК этот фактор влияет слабее. Несмотря на то, что проявление интеркаляционного механизма связывания БЭ с ДНК не зависит от ионной силы раствора, тем не менее уменьшение ионной силы раствора увеличивает значение константы связывания этим способом, так как двойная спираль ДНК становится более «открытой» для вклинивания лиганда в плоскость между парами оснований (см. [28-30]).

На первый взгляд несколько неожиданным является результат, полученный при ионной силе раствора 0,004 М, поскольку значение K_s на порядок меньше, чем при ионных силах раствора 0,002 и 0,01 М. Как было

показано выше, H33258 может с ДНК связываться интеркаляционным механизмом преимущественно в ГЦ богатых участках [189-194].

Полученные результаты плавления комплексов при 0,002 М также указывают на этот способ связывания при низких концентрациях H33258. 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. Исходя из этого, мы полагаем, что при ионной силе раствора 0,004 М уменьшение значения К обусловлено тем, что одновременно проявляются два способа - интеркаляция и АТ специфическое связывание, которые по разному влияют на структурное состояние ДНК. Вследствие этого возникают силы, взаимно ослабляющие эти способы: при интеркаляции спираль ДНК претерпевает значительные структурные перестройки, для чего она должна обладать значительной гибкостью. С другой стороны, локализация молекул H33258 в малом желобке и блокирование АТ богатых участков приводит к образованию с одной стороны «жестких» и «исключенных», с другой стороны, участков в ДНК, вследствие чего и интеркаляция, и желобковое связывание затрудняются, что отражается также на параметрах плавления (см. 3.2.).

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 H33258 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) [163,164], в то время как для реализации электростатического способа связывания с фосфатными группами структурные

перестройки спирали ДНК не могут быть определяющими, а также не могут препятствовать проявлению этого способа. Аналогичный эффект обнаруживается и в случае взаимодействия других катионных интеркаляторов с ДНК.

Близкие значения получены и для параметра n , однако, полученное при ионной силе раствора 0,004 М значение этого параметра опять же отличается от остальных. Тот факт, что n_s при этом имеет более низкое значение, указывает на то, что большее число нуклеотидных пар заняты лигандом. Этот факт также подтверждает то, что при ионной силе 0,004 М, при взаимодействии Н33258 с дц-ДНК одновременно проявляются два сильных (интеркаляция и желобковое) способов связывания, вследствие чего некоторое число пар оснований на некотором расстоянии от занятых центров могут стать общими для этих двух способов и стать «причиной» уменьшения длины реакционного центра.

Эти данные являются критерием мультимодальности Н33258 (см. также [166]), однако сравнение экспериментальных данных с теоретическими в рамках модели 1 не выявило совпадений в термодинамических параметрах взаимодействия с ДНК.

С одной стороны, это несоответствие нельзя однозначно отнести к тому, что разработанная модель справедлива только в случае интеркаляторов. С другой стороны, этот факт также нельзя исключить, несмотря на то, что получены данные только для желобково связывающегося лиганда Н33258. Тем не менее, нет основания обобщения этого заключения для всех неинтеркаляторов и возможно, что вследствие скрининга широкого круга таких веществ, обнаружатся соединения, которые отвечают требованиям теоретической модели 1 и, наряду с интеркаляторами, могут быть включены в подкласс таких мультимодальных лигандов, термодинамические свойства которых при взаимодействии с ДНК можно предсказать в рамках этой модели.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что:

- проявление основного механизма связывания Н33258 с дц-ДНК зависит от

ионной силы раствора;

- являясь желобково связывающимся лигандом, Н33258 также может связываться с дц-ДНК интеркаляционным механизмом;
- специфичность Н33258 к АТ последовательностям также зависит от ионной силы раствора;
- ионная сила раствора влияет на величину константы АТ специфического связывания Н33258;
- при ионной силе раствора 0,004 М Н33258 с ДНК связывается двумя сильными способами, которые взаимно ослабляют друг друга;
- при проявлении двух сильных способов связывания определенное число пар нуклеотидов становится одновременно вовлеченным в область, находящей под влиянием интеркаляции или желобкового связывания;
- слабый способ связывания Н33258 с ДНК не проявляет зависимость от ионной силы раствора, несмотря на то, что имеет электростатическую природу;
- в интервале изменения ионной силы раствора от 0,002 М до 0,02 М проявляется электростатический способ связывания Н33258 с ДНК;
- проявляя мультимодальность при связывании с ДНК, тем не менее Н33258 не удовлетворяет требованиям теоретической модели 1, поскольку термодинамические параметры связывания, рассчитанные с помощью этой модели, не совпадают с экспериментальными.

ГЛАВА 5

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5.1. Использованные препараты и приборы

Препараты: В работе были использованы следующие препараты: 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), (все препараты из “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 использовались без дополнительной очистки.

Концентрации использованных препаратов были 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)] - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ДНК тимуса теленка - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ДНК Cl. perfr. - $\epsilon_{260}=7400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ДНК M. lysodeikt. - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; БЭ - $\epsilon_{480}=5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 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 - $\mu = 0,002; 0,004; 0,01; 0,02$ и $0,154 \text{ M}$. Кислотная денатурация ДНК и ДНК-БЭ комплексов осуществлялась при $2.5 \leq \text{pH} \leq 7.0$.

Приборы: Исследования спектроскопическими методами проводились на спектрофотометрах

- UV VIS PYE Unicam-SP8-100 (Англия),
 - UV VIS Specord 50 Analitik Jena (Германия),
 - Jenway 6715 (Англия),
- и на спектрофлуориметре

- Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия).

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами проводилось с помощью спектрофотометра PVE Unicam-SP8-100, нагрев термостатируемых 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). Спектроскопические измерения осуществлялись в кварцевых кюветах объемом 3 мл, длиной оптического пути 1 см. Измерения в интервале рН 2.5-7.0 проводили при комнатной температуре ($t=25^{\circ}\text{C}$), при ионной силе $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}\text{M}$.

Электрохимические измерения проводились на электроанализаторе BAS 100 В/В. рН-титрование осуществлялось на иономере универсальный ЭВ-74 (СССР) с электродом измерительным ЭСЛ 63-07. Раствор ДНК титровался 0.2н HCl с шагом объема добавляемого титранта 2 мкл. Перед измерением значений рН, растворы перемешивались на магнитной мешалке. Погрешность значений рН составляла ± 0.05 . Измерения при рН=3.0 проводились при $t=25^{\circ}\text{C}$.

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

5.2. Переход спираль-клубок ДНК и ее комплексов с лигандами методом УФ денатурации

ДНК в физиологических условиях обычно находится в дц-состоянии при комнатной температуре и давлении в 1 атм, при нейтральных значениях рН. Однако, если повысить температуру раствора ДНК и ее комплексов с лигандами до 80-90 $^{\circ}\text{C}$, или изменить реакцию (рН) в кислую или щелочную сторону, а также под влиянием различных агентов происходит переход спираль-клубок, в результате которого дц-структура ДНК разрушается и она

переходит в оц- (клубкообразное) состояние. Изучение этого перехода осуществляется разными, в том числе, спектроскопическими методами [3].

Переход спираль-клубок обратим, поскольку можно достичь практически абсолютно точного спаривания разошедшихся цепей, если создаются подходящие условия. Этот процесс называется ренатурацией и имеет прикладное значение [17].

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами осуществлялось в герметически закрытых тefлоновыми пробками кварцевых кюветах. Перед плавлением и после кюветы с препаратами периодически взвешивались при комнатной температуре и изменений в весе не наблюдалось.

Температура измеряется непосредственно в кюветах с помощью платинового резистора и данные выводятся на монитор ПК с помощью программы, разработанной в среде LabView.

Кривые плавления строились в программной среде Microsoft Excel. Для получения равновесных кривых плавления в случае синтетических полинуклеотидов, ДНК и их комплексов с лигандами, плавление осуществлялось дискретным и непрерывным повышением температуры.

В случае дискретного повышения температуры, для каждой точки в интервале плавления поглощение регистрировалось через 8-10 мин., для установления температурного равновесия в кюветах. При непрерывном нагревании с помощью программного устройства SP 876 Series 2 температура повышалась со скоростью 0,25 град/мин., а значения поглощения выводились на монитор ПК через 2 мин. Полученные таким образом кривые плавления сравнивались друг с другом, они различались незначительно.

5.3. Приготовление комплексов ДНК с исследованными лигандами

При исследовании комплексообразования с ДНК растворы лигандов титрировались концентрированным раствором ДНК. Спектры поглощения ее

комплексов с лигандами получены в интервале изменения длины волны поглощения данного лиганда в видимой или УФ области, вдали от интервала поглощения ДНК: $400 \leq \lambda \leq 600$ нм в случае БЭ, $300 \leq \lambda \leq 400$ нм в случае Н33258, $600 \leq \lambda \leq 800$ – в случае МС. Спектры флуоресценции комплексов ДНК-БЭ регистрировались в интервале $450 \leq \lambda \leq 700$ нм, при длине волны возбуждения флуоресценции БЭ $\lambda = 480$ нм. В случае Н33258 спектры флуоресценции регистрировались в интервале $350 \leq \lambda \leq 600$ нм, при длине волны возбуждения флуоресценции Н33258 $\lambda = 345$ нм, в случае МС спектры флуоресценции регистрировались в интервале $300 \leq \lambda \leq 800$ нм, при длине волны возбуждения флуоресценции МС $\lambda = 290$ нм.

При исследовании комплексообразования концентрации лигандов оставались постоянными, концентрационные соотношения r изменялись в интервале – $0 \leq r \leq 0,5$ в случае БЭ и $0 \leq r \leq 0,33$ в случае МС и Н33258 ($r = \text{лиганд}/\text{ДНК}$, рассчитанное на пару оснований ДНК). Спектры поглощения растворов комплексов зарегистрированы против растворов свободных лигандов при исследовании методом дифференциальной спектроскопии (ДС).

5.4. Методы абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии в изучении взаимодействия лигандов с ДНК

При спектроскопических исследованиях растворы лигандов титровались раствором ДНК и регистрировались спектры поглощения и флуоресценции комплексов. Для установления полностью связанного состояния лигандов концентрация ДНК в растворах лигандов увеличивалась до тех пор, пока интенсивности поглощения и флуоресценции изменялись. Начиная с определенных концентраций ДНК в растворе, изменения значений поглощения и флуоресценции комплексов указанных лигандов с ней становятся

незначительными, что обусловлено тем, что в растворе практически все молекулы лиганда находятся в связанном состоянии.

При спектроскопических исследованиях использовались герметически закрывающиеся кварцевые кюветы. Анализ значения поглощений и флуоресценции проводился с помощью компьютерной программы Excel.

5.5. Определение связанных молекул лигандов из спектров поглощения и флуоресценции

Для построения кривых связывания лигандов в координатах Скетчарда необходимо определить доли связанных и свободных молекул лиганда. Для этого, из спектров поглощения комплексов лиганд-ДНК концентрацию свободных молекул лиганда определяется с помощью следующей формулы:

$$C_f = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \cdot C_0 \quad (5.1)$$

где A – поглощение комплекса при данной концентрации ДНК, A_0 – поглощение лиганда в отсутствие ДНК, A_∞ – поглощение лиганда при полностью связанном состоянии. C_0 – полная концентрация лиганда в растворе:

$$C_0 = C_f + C_b$$

где C_f и C_b – концентрации свободных и связанных молекул лиганда в растворе.

С помощью C_b можно определить долю молекул лиганда, находящихся в комплексе с ДНК:

$$r = \frac{C_b}{C_p}$$

где C_p – концентрация фосфатных групп ДНК в растворе. В случае БЭ, на основании спектров флуоресценции, концентрацию связанных молекул лиганда определяли используя уравнение:

$$\frac{c_r^\Phi(t)}{c_0(t)} = \frac{[I(t) - I_1(t)]}{[I_2(t) - I_1(t)]} \quad (5.2)$$

где $I(t)$ - интенсивность флуоресценции комплекса при данной концентрации ДНК, $I_1(t)$ интенсивность флуоресценции БЭ в свободном, $I_2(t)$ - его интенсивность при полностью связанном состояниях. Общая концентрация лиганда - $c_0=c_1+c_2$ где c_1 концентрация свободных молекул и определена с помощью абсорбционных измерений, c_2 - концентрация связанных молекул лиганда в растворе и является суммой $c_2=c_2^{\phi}+c_2^{н\phi}$, где c_2^{ϕ} - концентрация связанных флуоресцирующих молекул красителя, $c_2^{н\phi}$ - концентрация связанных нефлуоресцирующих молекул в случае БЭ. На основании (5.1) определены значения $r_{\phi}=c_2^{\phi}/c_p$, $r^{н\phi}=c_2^{н\phi}/c_p$, $r=r^{\phi}+r^{н\phi}$, учитывая, что c_p - концентрация фосфатных групп дезоксирибонуклеотида.

В случае МС и Н33258 концентрация свободных и связанных молекул лиганда, а также значение r/C_f определялись по уравнениям:

$$C_F = C_0 \left(\frac{I}{I_0} - q \right) / (1 - q) \quad (5.3)$$

$$C_B = C_0 - C_F \quad (5.4)$$

$$\frac{r}{C_F} = Kn - Kr \quad (5.5)$$

q является отношением квантового выхода флуоресценции суммарных связанных и свободных молекул лиганда к квантовому выходу свободного лиганда, I_0 - флуоресценция лиганда в отсутствие, I - флуоресценция лиганда в присутствии ДНК, n - число нуклеотидов, приходящих на одно место связывания лиганда, K - константа связывания. q определяется с помощью линейной зависимости I/I_0 от $1/[\text{ДНК}]$.

5.6. Методы дифференциальной импульсной и квадратно-волновой вольтамперометрии

Вольтамперометрические измерения растворов при комплексообразовании БЭ с ДНК проводились с использованием трехэлектродной системы

(3C cell stand) электрохимического анализатора BAS 100 B/w (Bioanalytical systems Inc., US), который управляется ПК, с помощью специальной программы "BAS" (разработанной корпорацией Bioanalytical systems Inc., US). Рабочим электродом служит стеклянноуглеродный электрод GCE, электродом сравнения – Ag/AgCl (в 3,0 М NaCl), вспомогательным - Pt электрод.

Измерения осуществлялись в электрохимической ячейке с термостатируемой водяной рубашкой, которая соединена с циркулирующим термостатом. Температура в электрохимической ячейке устанавливалась с точностью $\pm 0,1$ °C. Работа системы электрохимического анализа была проверена с помощью стандартного раствора $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, для калибровки которого получен линейный коэффициент корреляции – 0,999.

Все данные с "BAS" анализировались с помощью программы Excel (Microsoft). Изотермы адсорбции и термодинамические параметры связывания БЭ с ДНК получены с помощью математической программы SigmaPlot (версия 4) [280].

Электрохимические измерения комплексообразования БЭ с ДНК осуществлялись при ионных силах 0,02 М и 0,154 М, при $\text{pH} \approx 7,0$. Перед каждым экспериментом GCE электрод поочередно промывался метанолом, ацетоном и деионизированной водой 8-10 раз, после чего отполировывался $0,05 \mu\text{m}$ алюминиевым полировочным порошком (Bioanalytical Systems Inc., US). Обработанный таким способом электрод повторно промывался метанолом, деионизированной водой и ацетоном 8-10 раз поочередно. После этой процедуры электрод ополаскивался деионизированной водой и активировался по методике, описанной в [295]. Активация GCE электрода осуществлялась с применением потенциала 1,20 V, в присутствии электрода сравнения Ag/AgCl (в 3,0 М NaCl), в перемешиваемом водном растворе 0,5 М NaOH в течение 10 мин. Активированный GCE электрод промывался деионизированной водой и фоновым электролитом. Во всех измерениях рабочие растворы перемешивались с помощью магнитной мешалки со скоростью 700 rpm, с использованием

магнитной вертушки с тефлоновым покрытием. Растворы предварительно барботировались газовым азотом в течении 60 минут для удаления растворенного кислорода.

Дифференциальные импульсные и квадратно-волновые вольтамперограммы растворов БЭ и его комплексов с ДНК получены в интервале изменения потенциалов от 300 до 1150 mV и 710 ± 20 mV, соответственно. При вольтамперометрическом титровании использовалась величина тока при характерном потенциале окисления 700 ± 20 mV. Сила тока зависит от концентрации электрохимически активных свободных молекул лиганда.

При титрации БЭ раствором ДНК каждый раз определялась зависимость величины предельного тока от первоначальной концентрации БЭ и строилась калибровочная кривая. Дифференциальные импульсные и квадратно-волновые вольтамперограммы регистрировались через 20-25 минут для установления равновесия в электрохимической ячейке. Разбавление первоначального раствора составляла 8 % и учитывалась при анализе данных.

5.7. Построение графиков Скетчарда

Взаимодействие лигандов с ДНК является химическим процессом и в случае обратимых реакций основывается на определении константы равновесия. В основе этих взаимодействий лежит связывание одного или нескольких молекул лиганда (L) с макромолекулой (E), имеющей несколько мест связывания



Это уравнение дает возможность определить K с помощью:

$$K = \frac{[E][L]}{[EL]} \quad (5.7)$$

где K – равновесная константа связывания. Определение значения K дает возможность проводить полный термодинамический анализ системы (см. выше). При взаимодействии с одним центром связывания $n=1$ и K определяется по (5.9). Для определения числа молей связанного лиганда с одним молекул макромолекулы вводится параметр ϑ , который определяется по следующему уравнению:

$$\vartheta = \frac{[EL]}{[EL] + [E]} \quad (5.8)$$

С помощью одновременного решения (5.9) и (5.10) определяется K , поскольку ϑ можно оценить экспериментально [233,234].

Поставляя (5.9) в (5.10) получается:

$$\vartheta = \frac{[L]}{K + [L]} \quad (5.9)$$

и график зависимости ϑ от L представляет собой гиперболу. Для линеаризации этого графика Скетчард преобразовал (5.9), разделив обе части уравнения на $[L]$ и получил:

$$\frac{\vartheta}{[L]} = \frac{1}{K} - \frac{\vartheta}{K} \quad (5.10)$$

Зависимость $\vartheta/[L]$ от ϑ дает прямолинейную кривую, тангенс угла наклона которой есть K в случае одного центра связывания [233,234].

Метод Скетчарда позволяет анализировать также взаимодействие лигандов с макромолекулами при существовании нескольких идентичных или неидентичных центров адсорбции. В этом случае (5.9) принимает вид:

$$\vartheta = \frac{n[L]}{K + [L]} \quad (5.11)$$

а график Скетчарда становится непрямолинейным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана теория кооперативных переходов комплексов ДНК с лигандами, в которой учитывается возможность одновременного образования произвольного числа типов комплексов с различными формами ДНК. Полученные соотношения, описывающие многопараметрическую зависимость изменения параметров плавления ДНК-лиганд комплексов от концентрации лиганда дают возможность определить термодинамические величины комплексов и проводить полный термодинамический анализ системы.

Эта теория позволяет предугадать различные способы связывания лигандов с ДНК, которые скрыты под другие и, с этой точки зрения, дает возможность среди многочисленных соединений выявить и выделить мультимодальные лиганды.

Теоретическая модель также позволяет выявить возможность связывания мультимодальных лигандов с оц-ДНК и теоретически рассчитать термодинамические параметры связывания. Одной из важных выводов этой модели то, что одновременное связывание одного типа лиганда с ДНК нельзя сводить к связыванию двух различных лигандов, которые взаимодействуют с ней одним способом, однако эти способы различаются друг от друга.

Анализ данных по взаимодействию различных лигандов с ДНК с помощью разработанной теории позволяет также выявить те условия, при которых 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 рН 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 не все способы связывания этого лиганда с ДНК проявляются. 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 позволят отнести этот лиганд в подкласс мультимодальных.

То же самое нельзя сказать в случае неинтеркалятора, желобково связывающегося соединения Н33258. Экспериментальные исследования выявляют, что ионная сила раствора радикально меняет механизмы связывания этого лиганда с ДНК, при этом, при определенных условиях этот лиганд может с ДНК связываться двумя противоположными механизмами, один из которых соответствует принципу «ключ к замку» (желобковое связывание), другой – так называемый «fit-to-fit» (интеркаляция, в результате чего молекулы лиганда и ДНК должны подходить друг к другу). Эти противоположные механизмы связывания Н33258 с ДНК обуславливают колоколообразное изменение ширины интервала плавления комплексов. Тем не менее, сравнение данных теоретического анализа с помощью разработанной теории с экспериментальными не выявляет соответствие, что указывает на то, что Н33258, хотя и с ДНК может связываться несколькими способами одновременно, однако этот лиганд не удовлетворяет требованиям теории.

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 рН 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 H33258 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 H33258 или неклассического интеркалятора МС, изменение ионной силы приводит к изменению способов их связывания с ДНК как в отсутствие, так и в присутствии других лигандов.

Осуществление данной работы было бы невозможно усилиями одного человека, несмотря на все старания. В связи с этим считаю своим обязательным долгом выразить глубокую благодарность всем, кто оказал содействие - в той или иной степени помог ее осуществлению.

Особо хочу выразить большую благодарность заведующему кафедры биофизики Ереванского государственного университета, моему научному консультанту, доктору биологических наук, профессору Погосу Оганесовичу Вардеваняну, непосредственное участие которого безмерно содействовало воплощению в жизнь проведенного исследования.

Выражаю также благодарность всем соавторам моих работ, которые своим участием способствовали осуществлению данной работы. Также выражаю благодарность всем, кто ознакомился с данной работой или ее отдельными фрагментами и своими замечаниями, предложениями и рекомендациями содействовал ее улучшению.

□ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Graves D.E., Velea L.M. // Intercalative binding of small molecules to Nucleic Acids. *Curr. Org. Chem.* 2001, V 4, p. 915–929.
2. Франк-Каменецкий М.Д. // Самая главная молекула. (От структуры ДНК к биомедицине XXI века). Москва, 2017, Альпина нон-фикшн, 336 с.
3. Вардеванян П.О. Структурные переходы в ДНК и ДНК-белковых комплексах при различных функциональных состояниях генома. // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Ереван, 1990, с.246.
4. Зенгер В. // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот//. М.: Мир, 1987, с. 584.
5. Благой Ю.П. // Взаимодействие ДНК с биологически активными веществами. Соросовский образовательный журнал, 1998, N 10, с. 18-24.
6. Hess K. L., Andorko J. I., Tostanoski L. H., Jewell Ch. M. // Polyplexes assembled from self-peptides and regulatory nucleic acids blunt toll-like receptor signaling to combat autoimmunity. *Biomaterials* (2016), doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.052.
7. <http://uslide.ru/himiya/31969-matrichnie-biosintezi.html>
8. Amy Rhoden Smith, B.S. // Advances in DNA Binding by Threading Polyintercalation. Dissertation Presented to the Faculty of the Graduate School of The University of Texas at Austin in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy The University of Texas at Austin December 2013, 188 pages.
9. Morange M. // The Central Dogma of molecular biology. *Reson.* 2009, 14, p. 236–247.
10. Jayaram B., Singh T., Fenley M. // DNA-Drug Interactions. In *Methods for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions*. M. Wanunu and T. Yitzhak, eds. (Boca Raton: CRC Press), 2011, p. 315–336.

11. Leung C.H., Chan D.S.H., Ma V.P.Y., Ma D.L. // DNA-Binding Small Molecules as Inhibitors of Transcription Factors. *Med. Res. Rev.*, 2013, V. 33, p. 823–846.
12. Monaco R.R. // A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation. *J. Biomol. Struct. Dyn*, 2007, V 25, N 2, p. 119-125.
13. Костюков В.В., Милосердова Ю.Г., Шрам О.А., Рубинсон М.А., Евстигнеев М.П. // Энергетика димеризации лигандов, связывающихся в малый желобок ДНК. *Атомы и молекулы. Укр. Физь. Журнал*, 2014, т. 59, N 5, с. 461-473.
14. Nafisi Sh, Saboury A. A., Keramat N., Neault J.-F., Tajmir-Riahi H.-A. // Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 2007, v. 827, p. 35-43.
15. Hossain M., Giri P., Kumar G.S. // DNA Intercalation by Quinacrine and Methylene blue: A Comparative Binding and Thermodynamic Characterization Study. *DNA and Cell Biology*, 2008, v. 27, N 2, p. 81-90.
16. Zhao G.C., Zhu J.J., Zhang J.J., Chen H.Y. // Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin. *Anal. Chim. Acta*, 1999, V. 394, p. 337–344.
17. Rohs R., Sklenar H. // Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: Minor groove binding is favored over intercalation. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 2004, V. 21, N 5, p. 699-711.
18. Strekowski L., Wilson B. // Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research*, 2007, N 623, p. 3-13.
19. Gowda S.K.R., Mathew B.B., Sudhmani C.N., Naik H.S.B. // Mechanizm of DNA binding and Cleavage. *Biomedicine and Biothecnology*, 2014, V. 2, N 1, p. 1-9.
20. Palchaudhuri R., Hergenrother P.J. // DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of

- action. *Current Option in Biotechnology*, 2007, V. 18, N 6, p. 497-503.
21. <http://what-when-how.com/molecular-biology/b-dna-molecular-biology/>
 22. Mišković K., Bujak M., Baus Lončar M., Glavaš-Obrovac L. // Antineoplastic DNA-binding compounds: intercalating and minor groove binding drugs. *Arh. Hig Rada Toksikol.*, 2013, V. 64, N 4, p. 593-602.
 23. Yamori T., Matsunaga A., Sato S., Yamazaki K., Komi A., Ishizu K., Mita I., Edatsugi H., Matsuba Y., Takezawa K., Nakanishi O., Hiroshi Kohno H., Nakajima Y., Komatsu H., Andoh T., Tsuruo T. // Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an *in vitro* and *in vivo* human cancer cell line panel. *Cancer Res.*, 1999, V. 59, p. 4042-4049.
 24. David-Cordonnier M.H., Hildebrand M.P., Baldeyrou B., Lansiaux A., Keuser C., Benzschawel K., Lemster T., Pindur U. // Design, synthesis and biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, V. 42, p. 752-771.
 25. Bhuyan B.K., Newell K.A., Crampton S.L., Von Hoff D.D. // CC-1065 (NSC 298223), a most potent antitumor agent: kinetics of inhibition of growth, DMA synthesis, and cell survival. *Cancer Res.*, 1982; V. 42, p. 3532-3537.
 26. Wanga X., Chub N., Wanga N., Chao Liua Q., Jianga C., Wanga X., Ikejima T., Chenga M. // Newly synthesized bis-benzimidazole derivatives exerting anti-tumor activity through induction of apoptosis and autophagy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, V. 22, p. 6297-6300.
 27. Hirota M., Fujiwara T., Mineshita S., Sugiyama H., Teraoka H. // Distamycin A enhances the cytotoxicity of duocarmycin A and suppresses duocarmycin A-induced apoptosis in human lung carcinoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2007, V. 39, p.988-996.
 28. Костюков В.В., Евстигнеев М.П. // Изменение гидратации при связывании лигандов с малым желобком ДНК. *Физика живого*, 2010, т. 18, N 2, стр. 34-40.

29. Nguen B., Neidle S., Wilson D.W. // A role for water molecules in DNA-ligand minor groove recognition. *Acc. Chem. Res.*, 2009, V. 42, p. 11-21.
30. Degtyareva N.N., Wallace B.D., Bryant A.R., Loo K.M., Petty J.T. // Hydration changes accompanying the binding of minor groove ligands with DNA. *Biophys. J.* 2007, V. 92, p. 959-965.
31. Shi X., Macgregor R.B.J. // Volume and hydration changes of DNA-ligand interactions. *Biophys. Chem.*, 2007, V. 125, p. 471-482.
32. Misra V.K., Honig B. // On the Magnitude of the Electrostatic Contribution to Ligand-DNA Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995, V. 92, p. 4691–4695.
33. Костюков В.В., Хомутова Н.М. // Анализ электростатического вклада в энергию комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК. *Вестник СевНТУ. Вып. 99: Физика и математика*, 2009, зб. наук. пр., Севастополь: Вид-во СевНТУ, с. 61-66.
34. Wilson W.D. in E. Kool (Ed). // DNA and RNA intercalators, DNA and aspects of molecular biology, in: D. Barton, K. Nakamishi, (eds.), *Comprehensive Natural products Chemistry*, 1998, V. 7.
35. Martinez R., Chacon-Garcia L. // The search of DNA-intercalatores as an antitumoral drugs: What it worked and what did not work. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, V. 12, p. 127-151.
36. Wheate N.J., Brodie C.R., Collins J.G., Kemp S., Aldrich-Wright J.R. // DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007, V. 7, p. 627–648.
37. Boer D.R., Canals A., Col M. // DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. *Dalton Trans.*, 2008, p. 399–414.
38. Chaires J.B. // A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, V. 453, p. 26-31.

39. Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., B. De Pascual-Tereza, Ramos A. // Intercalators as anticancer drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, V. 7, p. 1745-1780.
40. Ihmels H., Faulhaber K., Wedaldi D., Dall'Acqua F., Viola G. // Interaction of organic dye molecules into double-stranded DNA. Part 2: The annelated quinolizinium ion as a structural motif in DNA intercalators. *Photochemistry and Photobiology*, 2005, V. 81, p. 1107-1115.
41. Chaires J.B. // Energetics of drug–DNA interactions. *Biopolymers*, 1997, V. 44, p. 201–215.
42. Chaires J.B. // Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. *Annu. Rev. Biophys.*, 2008, V. 37, p. 135–151.
43. Sasikala W.D., Mukherjee A. // Intercalation and de-intercalation pathway of proflavine through the minor and major grooves of DNA: roles of water and entropy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, V.15, p. 6446–6455.
44. Wilhelm M., Mukherjee A., Bouvier B., Zakrzewska K., Hynes J.T., Lavery R. // Multistep Drug Intercalation: Molecular Dynamics and Free Energy Studies of the Binding of Daunomycin to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, V. 134, p. 8588–8596.
45. Lei H., Wang X., Wu C. // Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations. *J. Mol. Graphics Model*, 2012, V. 38, p. 279–289.
46. Paik D.H., Perkins T.T. // Dynamics and Multiple Stable Binding Modes of DNA Intercalators Revealed by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, V. 51, p. 1811–1815.
47. Liaw Y.C., Gao Y.G., Robinson H., Van der Marel G.A., Van Boom J.H., Wang A.H.J. // Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry*, 1989, V. 28, p. 9913–9918.

48. Verweij J., Den Hartigh J., Pinedo H.M. // Antitumor Antibiotics. In *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, B.A. Chabner, and J.M. Collins, eds. (Philadelphia: J. B. Lippincott Company), 1990, p. 382–396.
49. Wakelin L.P.G., Bu X., Eleftheriou A., Parmar A., Hayek C., Stewart B.W. // Bisintercalating Threading Diacridines: Relationships between DNA Binding, Cytotoxicity, and Cell Cycle Arrest. *J. Med. Chem.*, 2003, V. 46, p. 5790–5802.
50. Liu Z.R., Hecker K.H., Rill R.L. // Selective DNA Binding of (N-alkylamine)-Substituted Naphthalene Imides and Diimides to G+C-rich DNA. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 1996, V. 14, p. 331–339.
51. Tumiatti V., Milelli A., Minarini A., Micco M., Gasperi Campani A., Roncuzzi L., Baiocchi D., Marinello J., Capranico G., Zini M. и др. // Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Substituted Naphthalene Imides and Diimides as Anticancer Agents. *J. Med. Chem.*, 2009, V. 52, p. 7873–7877.
52. Wang K., Wang Y., Yan X., Chen H., Ma G., Zhang P., Li J., Li X., Zhang J. // DNA binding and anticancer activity of naphthalimides with 4-hydroxyl-alkylamine side chains at different lengths. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, V. 22, p. 937–941.
53. Banerjee S., Veale E.B., Phelan C.M., Murphy S.A., Tocci G.M., Gillespie L.J., Frimannsson D.O., Kelly, J.M., Gunnlaugsson T. // Recent advances in the development of 1,8-naphthalimide based DNA targeting binders, anticancer and fluorescent cellular imaging agents. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, V. 42, p. 1601–1618.
54. Tanious F.A., Yen S.F., Wilson W.D. // Kinetic and equilibrium analysis of a threading intercalation mode: DNA sequence and ion effects. *Biochemistry*, 1991, V. 30, p. 1813–1819.
55. Yen S.F., Gabbay E.J., Wilson, W.D. // Interaction of aromatic imides with DNA. Spectrophotometric and viscometric studies. *Biochemistry*, 1982, V. 21, p. 2070–2076.

56. McKnight, R.E., Gleason, A.B., Keyes, J.A., and Sahabi, S. // Binding mode and affinity studies of DNA-binding agents using topoisomerase I DNA unwinding assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, V, 17, p. 1013–1017.
57. McKnight, R.E., Reisenauer, E., Pintado, M.V., Polasani, S.R., and Dixon, D.W. // Substituent effect on the preferred DNA binding mode and affinity of a homologous series of naphthalene diimides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, V. 21, p. 4288–4291.
58. Milelli, A., Tumiatti, V., Micco, M., Rosini, M., Zuccari, G., Raffaghello, L., Bianchi, G., Pistoia, V., Fernando Díaz, J., Pera, B. // Structure–activity relationships of novel substituted naphthalene diimides as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, V. 57, p. 417–428.
59. Hvastkovs E.G., Buttry D.A. // Recent advances in electrochemical DNA hybridization sensors. *Analyst*, 2010, V. 135, p. 1817–1829.
60. Takenaka S. // Electrochemical Detection of DNA with Small Molecules. In *Small Molecule DNA and RNA Binders*, M. Demeunynck, C. Bailly, and W.D. Wilson, eds. (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.), 2004, p. 224–246.
61. Takenaka S., Yamashita K., Takagi M., Uto Y., Kondo H. // DNA Sensing on a DNA Probe-Modified Electrode Using Ferrocenylnaphthalene Diimide as the Electrochemically Active Ligand. *Anal. Chem.*, 2000, V. 72, p. 1334–1341.
62. Sato S., Tsueda M., Takenaka, S. // Electrochemical detection of aberrant methylated gene using naphthalene diimide derivative carrying four ferrocene moieties. *J. Organomet. Chem.*, 2010, V. 695, p. 1858–1862.
63. Tansil N.C., Xie H., Xie F., Gao Z. // Direct Detection of DNA with an Electrocatalytic Threading Intercalator. *Anal. Chem.*, 2005, V. 77, p. 126–134.
64. Collie G.W., Promontorio R., Hampel S.M., Micco M., Neidle S., Parkinson G.N. // Structural Basis for Telomeric G-Quadruplex Targeting by Naphthalene Diimide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, V. 134, p. 2723–2731.
65. Micco M., Collie G.W., Dale A.G., Ohnmacht S.A., Pazitna I., Gunaratnam M., Reszka A.P., Neidle S. // Structure-Based Design and Evaluation of

- Naphthalene Diimide G-Quadruplex Ligands as Telomere Targeting Agents in Pancreatic Cancer Cells. *J. Med. Chem.*, 2013, V. 56, p. 2959–2974.
66. Kong D., Park E.J., Stephen A.G., Calvani M., Cardellina J.H., Monks A., Fisher R.J., Shoemaker R.H., Melillo G. // Echinomycin, a Small-Molecule Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 DNA-Binding Activity. *Cancer Res.*, 2005, V. 65, p. 9047–9055.
 67. González-Bulnes L., Gallego, J. // Analysis of mixed DNA-bisnaphthalimide interactions involving groove association and intercalation with surface-based and solution methodologies. *Biopolymers*, 2012, V. 97, p. 974–987.
 68. Menzel T.M., Tischer M., François P., Nickel J., Schrenzel J., Bruhn H., Albrecht A., Lehmann L., Holzgrabe U., Ohlsen K. // Mode-of-Action Studies of the Novel Bisquaternary Bisnaphthalimide MT02 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, V. 55, p. 311–320.
 69. Takenaka S., Takagi, M. // Threading Intercalators as a New DNA Structural Probe. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1999, V. 72, p. 327–337.
 70. Gaugain B., Markovits J., Le Pecq J.-B., Roques B.P. // DNA polyintercalation: comparison of DNA binding properties of an acridine dimer and trimer. *FEBS Lett.*, 1984, V. 169, p. 123–126.
 71. Laugâa, P., Markovits, J., Delbarre, A., Le Pecq, J.B., and Roques, B.P. // DNA Tris-intercalation: First Acridine Trimer with DNA Affinity in the Range of DNA Regulatory Proteins. Kinetic Studies. *Biochemistry*, 1985, V. 24, p. 5567–5575.
 72. Wirth, M., Buchardt, O., Koch, T., Nielsen, P.E., and Nordén, B. // Interactions between DNA and mono-, bis-, tris-, tetrakis-, and hexakis(aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation, viscometry, and equilibrium study. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, V. 110, p. 932–939.
 73. Levine L.A., Morgan C.M., Ohr K., Williams M.E. // Tetraplatinated Artificial Oligopeptides Afford High Affinity Intercalation into dsDNA. *J. Am. Chem.*

- Soc., 2005, p. 127, p. 16764–16765.
74. Far S., Kossanyi A., Verchère-Béaur C., Gresh N., Taillandier E., Perrée-Fauvet M. // Bis- and Tris-DNA Intercalating Porphyrins Designed to Target the Major Groove: Synthesis of Acridylbis-arginyl-porphyrins, Molecular Modelling of Their DNA Complexes, and Experimental Tests. *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, V. 2004, p. 1781–1797.
 75. Fernandez C.A., Baumhover N.J., Anderson K., Rice, K.G. // Discovery of Metabolically Stabilized Electronegative Polyacridine-PEG Peptide DNA Open Polyplexes. *Bioconjugate Chem.*, 2010, V. 21, p. 723–730.
 76. Fernandez C.A., Baumhover N.J., Duskey J.T., Khargharia S., Kizzire K., Ericson M.D., Rice K.G. // Metabolically stabilized long-circulating PEGylated polyacridine peptide polyplexes mediate hydrodynamically stimulated gene expression in liver. *Gene Ther.*, 2011, V. 18, p. 23–37.
 77. Lokey R.S., Kwok Y., Guelev V., Pursell C.J., Hurley L.H., Iverson B.L. // A New Class of Polyintercalating Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, V. 119, p. 7202–7210.
 78. Murr M.M., Harting M.T., Guelev V., Ren J., Chaires J.B., Iverson, B.L. // An octakis-intercalating molecule. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, V. 9, p. 1141–1148.
 79. Miller C.T., Weragoda R., Izbicka E., Iverson B.L. // The synthesis and screening of 1,4,5,8-naphthalenetetracarboxylic diimide–peptide conjugates with antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, V. 9, p. 2015–2024.
 80. Pengo P., Pantoş G.D., Otto S., Sanders J.K.M. // Efficient and mild microwave-assisted stepwise functionalization of naphthalenediimide with α -amino acids. *J. Org. Chem.*, 2006, V. 71, p. 7063–7066.
 81. Tambara K., Ponnuswamy N., Hennrich G., Pantoş, G.D. // Microwave-Assisted Synthesis of Naphthalenemonoimides and N-Desymmetrized Naphthalenediimides. *J. Org. Chem.*, 2011, V. 76, p. 3338–3347.
 82. Rhoden Smith A., Iverson B.L. // Threading Polyintercalators with Extremely Slow Dissociation Rates and Extended DNA Binding Sites. *J. Am. Chem. Soc.*,

- 2013, V. 135, p. 12783–12789.
83. Rhoden Smith A., Ikkanda B.A., Holman G.G., Iverson, B.L. // Subtle Recognition of 14-Base Pair DNA Sequences via Threading Polyintercalation. *Biochemistry*, 2012, V. 51, p. 4445–4452.
 84. Chu Y., Lynch V., Iverson, B.L. // Synthesis and DNA binding studies of bis-intercalators with a novel spiro-cyclic linker. *Tetrahedron*, 2006, V. 62, p. 5536–5548.
 85. Chu Y., Sorey S., Hoffman D.W., Iverson, B.L. // Structural Characterization of a Rigidified Threading Bisintercalator. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, V. 129, p. 1304–1311.
 86. Chu Y., Hoffman D.W., Iverson B.L.// A Pseudocatenane Structure Formed between DNA and a Cyclic Bisintercalator. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, V. 131, p. 3499–3508.
 87. Hansen J.B., Koch T., Buchardt O., Nielsen P.E., Nordén B., Wirth, M. // Trisintercalation in DNA by N-[3-(9-acridinylamino)propyl]-N,N-bis[6-(9-acridinylamino)hexyl]amine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, p. 509–511.
 88. Lee J., Guelev V., Sorey S., Hoffman D.W., Iverson B.L. // NMR Structural Analysis of a Modular Threading Tetraintercalator Bound to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, V. 126, p. 14036–14042.
 89. Holman G.G., Zewail-Foote M., Rhoden Smith A., Johnson K.A., Iverson B.L. // A sequence-specific threading tetra-intercalator with an extremely slow dissociation rate constant. *Nat. Chem.*, 2011, V. 3, p. 875–881.
 90. Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Порфирьева А.В. // Электрохимические ДНК-сенсоры для определения биологически активных низкомолекулярных соединений. *Рос. Хим. Ж. (Ж. Рос. Хим. об-а им. Д.И. Менделеева)*, 2008, т. LII, N 2, с. 66-79.
 91. Lee, H.K., Lee, M., Roh, H.W., Lee, N., Cho, Y.H., Jeong, J.B., Jung, H.N., Yang, W.S., and Ryu, G.H. // DNA chip evaluation as a diagnostic device. *Curr.*

- Appl. Phys., 2005, N 5, p. 433-437.
92. Domany, E. // Analysis of DNA-chip and antigen-chip data: studies of cancer, stem cells and autoimmune diseases. *Comp. Phys. Commun.*, 2005, V. 169, p. 183-187.
 93. Mockler T.C., Chan S., Sundaresan A., Chen H., Jacobsen S.E., Ecker J.R. // Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics*. 2005, V. 85, p. 1–15.
 94. Ke Y., Stuart L., Yung C., Yan L., Hao Y. // Self- assembled water-soluble nucleic acid probe tiles for label-free RNA hybridization assays. *Science*, 2008, N 5860 (319), p.180-183.
 95. Osipova T., Sokolova Z., Ryabykh T. et al. // Biochip-based test-system for cancer diagnostics. Simultaneous quantitation of total and free forms of prostate-specific antigene // *Nanotechnology*. CRC Press. Boston. V. 1–3, 2008. P. 30–33.
 96. // www.biochip-imb.ru, 2008. - biochip-imb.ru/diagnostics.html, 2010.
 97. Fesenko E.E., Kireev D., Gryadunov D.A., Khodakov D.A., Myznikova A.I., Mikhailovich V.M., Grebennikova T.V., Zasedatelev A.S. // Biological Microchips for genetic subtyping of Influenza A viruses. Труды Международного конгресса «Современные проблемы генетики».- том 1. – Минск, 2005, стр. 257.
 98. Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., Pan'kov S., Markova O., Kuz'min A., Chernousova L., Skotnikova O., Moroz A., Zasedatelev A., Mirzabekov A. // Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*, 2005; V. 11, p. 531–539.
 99. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0e/Microarray2.gif>.
 100. Lin X., Ni Yo., Kokot S. // An electrochemical DNA-sensor developed with the use of methylene blue as a redox indicator for the detection of DNA damage

- induced by endocrine-disrupting compounds. *Analytica Chimica Acta*, 2015, V 867, p. 29-37.
101. Jung Yu.K., Park H.G. // Colorimetric detection of clinical DNA samples using an intercalator-conjugated polydiacetylene sensor. *Biosens Bioelectron.* 2015 v. 72, p. 127-132. doi: 10.1016/j.bios.2015.04.093.
 102. Rubina A.Y., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S. // Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal. Biochem.* 2005, V.340. N 2. p. 317-329.
 103. Pasternack R.F., Goldsmith J.I., Szep S., Gibbs E.J. // A spectroscopic and thermodynamic study of porphyrin/DNA supramolecular assemblies. *Biophys. J.*, 1998, v. 75, p. 1024-1031.
 104. Лопаткин А.А. // Теоретические основания физической адсорбции. М.: МГУ, 1983.
 105. Карапетян А.Т., Пермогоров В.И., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. // Термодинамические исследования комплексов ДНК с красителями. *Мол. биол.*, 1972, т. 6, №6, с. 867-873.
 106. Карапетян А.Т., Вардеванян П.О., Терзикян Г.А., Франк-Каменецкий М.Д. // Влияние двух способов связывания лигандов на параметры перехода спираль-клубок ДНК. *Биополимеры и клетка*, 1989, т. 5, №5, с. 38-43.
 107. Karapetian A.T., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: The effect of two types of interaction of ligand on the parameters of transition. *J.Biomol. Struct. & Dyn.*, 1990, v. 8, N1, p. 123-130.
 108. Карапетян А.Т. // Энергетика кооперативных переходов в ДНК. Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук. Москва, 1987.
 109. Shich H.S., Berman H.M., Dabrow M., Neidle S. // The structure of drug-deoxydinucleoside phosphate complex. Generalizes conformational behavior

- of intercalation complexes with RNA and DNA fragments. Nucl. Acids Res., 1980, V. 8, p. 85-97.
110. Patel D.J., Canvel L.L. // Ethidium bromide (dC-dG-dC-dG)₂ complex in solution: Intercalation and sequence specificity of drug binding at the tetranucleotide duplex level. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1976, V. 73, p. 3343-3347.
 111. Wakelin L.P.G. // Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. Med. Res. Rev., 1986, V. 6, N 3, p. 375-390.
 112. Zimmer Ch., Wohnert U. // Non-intercalating DNA-binding ligands: Specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigation of the genetic material. Prog. Biophys. Mol. Biol., 1986, V. 47, p. 31-112.
 113. Seeman N.C., Day R.O., Rich A. // Nucleic acid-mutagen interactions. Cristal structure of adenylyl-3'-5'- uridine plus s-aminoacridine. Nature, 1975, V. 253, p. 324-326.
 114. Patel D.J. // Mutagen-nucleic acid complexes at the polynucleotide level in solution: Intercalation of proflavine into polyd(A-T) and the melting transitions of the complex. Biopolymers, 1977, V. 16, p. 2739-2754.
 115. Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Enthalpy of helix-coil transition of DNA: Dependence on Na⁺ concentration and GC-content. J.Biomol. Struct. Dyn., 1990, v. 8, N1, p. 131-138.
 116. Карапетян А.Т., Терзикян Г.А., Меграбян Н.М., Арутюнян С.Г., Вардеванян П.О. // Теория кооперативных переходов комплексов ДНК с мультимодальными лигандами. Мол. биол., 1995, т. 29, вып. 4, с. 841-847.
 117. Karapetian A.T., Terzikian G.A., Megrabyan N.M., Arutyunyan S.G., Vardevanian P.O. // Theory of cooperative transitions in DNA complexes with multimodal ligands. Mol. Biol., 1995, v. 29, N4(2), p. 487-490.
 118. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. // Theoretical treatment of

- melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. *J.Biomol. Struct. Dyn.*, 1996, v. 14, N2, p. 275-283.
119. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Antonian A.P., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Theoretical and experimental study of conformational transitions of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on different forms of DNA. *Structure, Motion, Interaction and Expression of Biological Macromolecules*, 1998, Proceedings of the tenth conversation, NY, Albany, p. 259-266.
 120. Marky L.A., Macgregor R.Jr. // Hydration of dA-dT polymers: Role of water in the thermodynamics of ethidium and propidium interaction. *Biochemistry*, 1990, v. 29, p. 4805-4811.
 121. Wilson W.D., Krishnamoorthy C.R., Yueh-Hwa Wang, Smith J.C. // Mechanism of intercalation: Ion effects on the equilibrium and kinetic constants for the interaction of propidium and ethidium with DNA. *Biopolymers*, 1985, V. 24, N 10, p. 1941-1961.
 122. Waring M.J. // DNA modification and cancer. *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, V. 50, p. 159-192.
 123. Wadkins R.M., Jovin T.M. // Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochem.*, 1991, v. 30. p. 9469-9478.
 124. Morozov V.F., Mamasakhlisov E.Sh., Hayryan Sh.A., Hu C.-K. Microscopical approach to the helix-coil transition in DNA. *Physica A*, 2000, v. 281, p. 51-59.
 125. Morozov V.F., Badasyan A.V., Grigoryan A.V., Sahakyan M.A., Mamasakhlisov E.Sh. // Stacking and hydrogen bonding: DNA cooperativity at melting. *Biopolymers*, 2004, v. 75, p. 434-439.
 126. Царукян А.В., Тоноян Ш.А., Бадасян А.В., Григорян А.В., Мамасахлисов Е.Ш., Морозов В.Ф. // Параметры порядка перехода спираль-клубок в биополимерах. *Известия НАН РА, Физика*, 2006, v. 41, p. 63-68.

127. Tonoyan Sh.A., Buryakina T.Yu., Tsarukyan A.V., Mamasakhlisov Y.Sh., Morozov V.F. // Generalized Model of Polypeptide Chain with two-scale interactions. *J. Contemp. Phys. (Armenian Ac. Sci.)*, 2007, v. 42, p. 309-315.
128. Tonoyan Sh.A., Mirzakhanyan A.S., Hayrapetyan G.N., Tsarukyan A.V., Morozov V.F. // Helix-coil transition of biopolymers in solvents interacting in competitive and non-competitive ways. *J. Contemp. Phys. (Armenian Ac. Sci.)*, 2010, v. 45, p. 88-93.
129. Badasyan A.V., Grigoryan A.V., Mamasakhlisov E.Sh., Benight A.S., Morozov V.F. // The helix-coil transition in heterogeneous double stranded DNA: Microcanonical method. *J. Chem. Phys.*, 2005, v. 123, p. 194701(1-6).
130. Мамасахлисов Е. Ш., Антонян А.П., Мамасахлисов 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.
131. Tonoyan Sh.A., Mirzakhanyan A.S., Mamasakhlisov Y.Sh., Morozov V.F. // On the theory of helix-coil transition in heterogeneous biopolymers. Constrained annealing method. *J. Contemp. Phys. (Armenian Ac. Sci.)*, 2013, v. 48, p. 236-242.
132. Grigoryan Z.A. // Collapse of the branched polymer on the example of RNA molecule. *Proc. of the YSU, Phys. and Math. Sciences*, 2015, 2, p. 56-61.
133. Mamasakhlisov Y.S., Grigoryan Z.A., Bellucci S., Hayryan S., Caturyan H., // Chin-Kun Hu Collapse and hybridization of RNA: view from replica technique approach. *The European physics journal E*, 2015. v. 38, <http://dx.doi.org/10.1140/epje/i2015-15100-x>.
134. Grigoryan Z.Z. // DNA - ligand complexes melting: the effect of multiple binding mechanisms. *Proc. of the YSU, Phys. and Math. Sciences*, 2016, 1, p. 52-57.
135. Chu E. // Physicians' cancer chemotherapy drug manual. E. Chu, V. T. DeVita., London: Jones and Bartlett Pub, 2003, 506 p.

136. Stockley I. H. // *Stockley's Drug Interactions*. I. H. Stockley. (6th ed.), London: Pharm. Press, 2002, P. 1080.
137. Gianni L., Salvatorelli E., Minotti G. // Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovascular Toxicology*, 2007, V. 7, N 2, p. 67-71.
138. Ferreira J. F. S., Luthria D. L., Sasaki T., Heyerick A. // Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*, 2010, V. 15, p. 3135-3170.
139. Мосунов А. А., Евстигнеев М. П. // Молекулярные механизмы действия ароматических биологически активных соединений на связывание антибиотика топотекана с ДНК. *Вестник Сев НТУ*, 2011, Вып.113, Серия: Физика биологических систем и молекул., стр. 99-105.
140. Евстигнеев В. П., Бучельников А. С., Лохова Д. С. // Теоретическое исследование интерцепторно-протекторного механизма действия ДНК-связывающихся ароматических препаратов в комбинации при низких концентрациях лиганда-перехватчика. *Севастопольский национальный технический университет, Биофизика складных систем*, 2010, стр. 3-14.
141. Coury J. E., McFail-Isom L., Williams L. D., Bottomley L. A. // A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: scanning force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.*, 1996, V. 93, N. 22, p. 12283—12286.
142. Hayashi M., Harada Y. // Direct observation of the reversible unwinding of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide. *Nucleic Acids Research*, 2007, V. 35, N 19, p. 1-7.
143. Kleinwächter V., Balcarová Z., Reinert K. E., Triebel H., Grezes J. R., Bar H. // A Study of Drug Binding to DNA by Partial Intercalation Using a Model Phenazine Derivative. *Gen. Physiol. Biophys.*, 1986. V. 5, p. 423-432.
144. Zhang G., Hu X., Fu P. // Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a

- fluorescence probe. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 2012, V. 108, p. 53-61.
145. Dehkordi M. N., Bordbara A.-Kh., Lincoln P., Mirkhani V. // Spectroscopic study on the interaction of ct-DNA with manganese Salen complex containing triphenyl phosphonium groups. *Spectrochimica Acta (Part A)*, 2012, V. 90, p. 50-54.
 146. Xie H.P., Chu X., Jiang J.H., Cui H., Shen G.L., Yu R.Q. // Competitive interactions of adriamycin and ethidium bromide with DNA as studied by full rank parallel factor analysis of fluorescence three-way array data. *Spectrochimica Acta (Part A)*, 2003, V. 59, p. 743-749.
 147. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodríguez E., Manzano J.L. // Determination of the DNA-binding characteristics of ethidium bromide, proflavine, and cisplatin by flow injection analysis: Usefulness in studies on antitumor drugs. *Analytical Biochemistry*, 2006, V. 355, p. 157-164.
 148. Piosik J., Wasielewski K., Woziwodzka A., Sledz W., Gwizdek-Wisniewska A. // De-intercalation of ethidium bromide and propidium iodine from DNA in the presence of caffeine. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2010, V. 5 (1), p. 59- 66.
 149. Iermak Ie., Woziwodzka A., Gwizdek-Wisniewska A., Piosik J. // Light-absorption spectroscopy of mutagen-DNA complex in presence of competing biologically active compounds. *General Assembly and Scientific Symposium 2011, XXXth URSI*, p. 1-4.
 150. Luedtke, N. W., Liu, Q., Tor, Y. // On the Electronic Structure of Ethidium. *Chem. Eur. J.*, 2005, V. 11, p. 495-508. [doi:10.1002/chem.200400559](https://doi.org/10.1002/chem.200400559).
 151. Geerts S., Kageruka P., De Deken R., Brandt J.R.A., Kazadi J.M., Diarra B., Eisler M.C., Lemmouchi Y., Schacht E., Holmes P.H. // Prophylactic effects of isometamidium- and ethidium-sustained release devices against *Trypanosoma congolense* in cattle. *Acta Trop.*, 1997, V. 65, p. 23-31.
 152. Murilla G. A., Peregrine A. S., Ndung'u J. M., Holmes P.H., Eisler. M.C. // The effects of drug-sensitive and drug-resistant *Trypanosoma congolense*

- infections on the pharmacokinetics of homidium in Boran cattle. *Acta Trop.*, 2002, V. 81, p. 185-195.
153. Lecoint P., Bichet N., Fraire C., Paoletti C. // The hepatic metabolism of ethidium bromide to reactive mutagenic species: biochemical and structural requirements. *Biochem. Pharmacol.*, 1981, V. 30, p. 601-609.
 154. Izatt R.M., Christensen J.J., Rytting J.H. // Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid and their constituent bases, nucleosides and nucleotides. *Chem. Rev.*, 1971, v.71, N5, p. 439-481.
 155. Smolyaninova T.I., Zhidkov V.A., Sokolov G.V. // Analysis of difference spectra of protonated DNA determination of degree of protonation of nitrogen bases and the fractions of disordered nucleotide pairs. *Nucleic Acids Res.*, (1982), 10, N8, p. 2121-2134.
 156. Касьяненко Н.А., Бартошевич С.Ф., Фрисман Э.В. // Исследование влияния рН среды на конформацию молекулы ДНК. *Молекулярная биология*, (1985), т. 19, вып. 5, с. 1386-1393.
 157. Ахрем А.А., Арутюнян С.Г., Асланян В.М., Ландо Д.Ю., Далян Е.Б., Шпаковский А.Г. // Переход спираль-клубок ДНК в щелочной среде. *Молек.биол.*,(1989), т.23, Вып.2, с. 518-525.
 158. Lando D. Yu., Haroutiunian S.G., Kul'ba A.M., Dalian E.B., Orioli P., Mangani S., Akhrem A.A. // Theoretical and experimental study of DNA helix-coil transition in acidic and alkaline medium. *J. Biomolec. Struct. Dynam.* (1994), v. 12, 2, p.355-366.
 159. <http://2014/06/Art-of-the-Cell-Unwinding-DNA.jpg?resize=1080%2C675>
 160. Антонян А.П. // Мультимода́льное взаимодействие лигандов с ДНК. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Ереван, 1998, с.112.
 161. Վարդևանյան Պ.Հ. // Նուկլեինաթթուների կենսաֆիզիկա: Բոհակախն

ձեռնարկ: Հայրապետ հրատ., Երևան, 2010, 212 էջ:

162. Frank-Kamenetskii M.D. // Simplification of the empirical relationship between melting temperature of DNA, its GC content and concentration of sodium in solution. *Biopolymers*, 1971, V. 10, N 12, p. 2623-2624.
163. 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.
164. Кантор Ч., Шиммел П. // Биофизическая химия. 1985, т. 3, М.:Мир. 534 с.
165. Lane A.N., Jenkins T.C. // Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 2000, v. 33, N3, p. 255-306.
166. Jones R.L., Wilson W.D. Effect of ionic strength on the pK_a of ligands bound to DNA. *Biopolymers*, 20, p. 141-154, 1981.
167. Steinmetzer K., Reinert K.-E. // Multimode interaction of Hoechst 33258 with eukaryotic DNA; Quantitative analysis of DNA conformational changes. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 1998, V. 15, N 4, p. 779-791.
168. Zurek-Biesiada D., Waligorski P., Dobrucki J.W. // UV-induced spectral shift and protonation of DNA fluorescent dye Hoechst 33258. *J. Fluoresc.*, 2014, V. 24, p. 1791-1801, DOI 10.1007/s10895-014-1468-y.
169. Zurek-Biesiada D., Kedraka-Krok S., Dobrucki J.W. // UV-activated conversion of Hoechst 33258, DAPI, and Vybrant DyeCycle fluorescent dyes into blue-excited, green-emitting protonated forms. *Cytometry A*, 2013, V. 83(5), p. 441-451.
170. Aleman C., Namba A.M., Casanovas J. // Acid-base and electronic structure-dependent properties of Hoechst 33342. *J. Biomol. Struct. and Dyn.*, 2005, V. 23(1), p. 29-36.
171. Ladinig M., Leupin W., Meuwly M., Respondek M., Wirz J., Zoete V. // Protonation equilibria of Hoechst 33258 in aqueous solution. *Helv. Chim. Acta*, 2005, V. 88(1), p. 53-67.

172. Barooah N., Mohanty J., Pal H., Sarkar S.K., Mukherjee T., Bhasikuttan A.C. // pH and temperature dependent relaxation dynamics of Hoechst 33258: a time resolved fluorescent study. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, V. 10(1), p. 35-41.
173. Barooah N., Mohanty J., Pal H., Bhasikuttan A.C. // Supramolecular assembly of Hoechst 33258 with cucurbit[7]uril macrocycle. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, V. 13(28), p. 13117-13126.
174. Szczurek A.T., Prakash K., Lee H.K., Zurek-Biesiada D.J., Best G., Haggmann M., Dobrucki J.W., Cremer C., Birk U. // Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes. *Nucleus*, 2014, 19:5(4).
175. Bazulina N.P., Nikitin A.M., Rodin S.A., Surovaya A.N., Kravatsky Yu.V., Pismensky V.F., Archipova V.S., Martin R., Gursky G.V. // Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA. *J. Biomol. Struct. and Dyn.*, 2009, V. 26, N 6, p. 701-718.
176. Vekshin N. // Binding of Hoechst with nucleic acids using fluorescence spectroscopy. *Journal of Biophysical Chemistry*, 2011, V. 2, N 4, p. 443-447.
177. Vekshin N. // *Biophysics of DNA-antibiotic complexes*. Nova Press. Inc. New-York., 2011.
178. Vekshin N. // *Fluorescence spectroscopy of biomacromolecules*. Photon-vek, 2009, Pushchino.
179. Murata S., Herman P., Lakowicz J.R. // Texture analysis of fluorescence lifetime images of AT- and GC-rich regions in nuclei. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2001, V. 49, p. 1443-1452.
180. Adhikary A., Buschmann V., Muller Ch., Sauer M. // Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA. *Nucleic Acids Research*, 2003, V. 31, p. 2178-2186. Doi:10.1093/nar/gkg308.
181. Abu-Daya, A., Philip M.B., Fox K.R. // DNA sequence preferences of several

- AT-selective minor groove binding ligands, *Nucleic Acids Res.*, 1995, V. 23, p. 3385-3392.
182. Han F., Taulier N., Chalikian T. // Association of the Minor Groove Binding Drug Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)₂: Volumetric, Calorimetric and Spectroscopic Characterizations. *Biochemistry*, 2005, v. 44, p. 9785-9794.
183. Parkinson J.A., Barber J., Douglas K., Rosamond J., Sharples D. Minor-groove recognition of the self-complementary duplex d(CGCGAATTCGCG)₂ by Hoechst 33258: a high-field NMR study // *Biochemistry*, 1990. V. 29. p. 10181-10190.
184. Parkinson J.A., Ebrahimi S.E., Mckie J.H., Douglas K.T. // Molecular design of DNA-directed ligands with specific interaction: solution NMR studies of the interaction of m-hydroxy analogue of Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)₂. *J. Biochemistry*, 1994, V. 33, p. 8442-8452.
185. Bostock-Smith C.E., Laughton C.A., Searle M.S. Solution structure and dynamics of the A-T tract DNA decamer duplex d(GGTAATTAACC)₂: implications for recognition by minor groove binding drugs. *J. Biochem.* 1999, V. 342, p. 125-132.
186. Breusegem S.Y, Clegg R.M., Lootiens F.G. // Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)₄ DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. *J. Mol. Biol.*, 2002, V. 315, p. 1049-1061.
187. Breusegem S.Y., Sadat-Ebrahimi S.E., Douglas K.T., Bichenkova E.V., Clegg R.M., Lootiens F.G. // Experimental Precedent for the need to involve the primary hydration layer of DNA in lead drug design. *J. Med. Chem.*, 2001, V. 44, p. 2503-2506.
188. Pjura P.E., Grzes Kowiak K., Dickerson R.E. // Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA. *J. Mol. Biol.*, 1987, V. 197, p. 257-271.
189. Rosu F., Gabelica V., Houssier C., De Pauw E. // Determination of affinity, stoichiometry and sequence selectivity of minor groove binder complexes with

- double-stranded oligonucleotides by electrospray ionization mass spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 2002, V. 30, p. 82.
190. Ismail M.A., Rodger P.M., Rodger A. // Drug self-assembly on DNA: sequence effects with trans-bis-(4-N-methylpyridiniumyl)diphenyl porphyrin and Hoechst 33258. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2000. V. 11. p. 335-348.
 191. Kakkar R., Suruchi, Grover R. // Theoretical study of molecular recognition by Hoechst 33258 derivatives. *J Biomol Struct & Dynam.*, 2005, V. 23, p. 37-47.
 192. Antonyan A.P. // Different modes of binding of Hoechst 33258 with DNA. *Biolog. Journal of Armenia*, 2015, 3 (67), p 6-10.
 193. Hurley L.H. // Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, V. 29, p. 692-696.
 194. Hurley L.H. // DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat. Rev.*, 2002, V. 2, p. 188-200.
 195. Maiti M., Suresh Kumar G. // Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological properties. *Med. Res. Rev.*, 2007, V. 27(5), p. 649-695.
 196. Hecht C., Friedrich J., Chang T.C. // Interactions of thionine with DNA strands: intercalation versus external stacking. *J. Phys. Chem. B*, 2004, V. 108(29), p. 10241-10244.
 197. Chatterjee D., Dasgupta S., Rao N.N. // Visible light assisted photodegradation of halocarbons on the dye modified TiO₂ surface using visible light. *Solar Energy Mater Solar Cells*, 2006, V. 90(7-8), p. 1013-1020.
 198. Chatterjee M., Bhowmik B.B., Moulik S.P. // Photophysical studies of thionine dye in alkanols (amphiphilic solvents), micelles and reverse micelles (microemulsions) an approach for polarity evaluation of different media. *J. Surf. Sci. Tech.*, 2000, V. 16(1-4), p. 90-104.
 199. Rodrigues M.R., Catalina F., Neumann M.G. // Photoinitiation of MMA polymerization by thionine/ amine systems in the presence of SDS micelles. *J.*

- Photochem. Photobiol. A Chem. 1999, V. 124(1-2), p. 29-34.
200. Yang H, Yuan R., Chai Y., Zhou Y. // Electrochemically deposited nanocomposite of chitosan and carbon nanotubes for detection of human chorionic gonadotrophin. *Colloids Surface B Biointerfaces*, 2011, V. 82(2), p. 463-469.
 201. Yu R., Wang L., Xie Q., Yao S. // High-performance amperometric sensors using catalytic platinum nanoparticles-thionine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite. *Electroanalysis*, 2010, V. 22(23), p. 2856-2861.
 202. Mondal A., Basu R., Das S., Nandy P. // Increased quantum efficiency in hybrid photoelectrochemical cell consisting of thionine and zinc oxide nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2011, V. 211(2-3), p. 143-146.
 203. Tuite E., Kelly J.M. // The interaction of methylene blue, Azure B, and thionine with DNA: formation of complexes with polynucleotides and mononucleotides as model systems. *Biopolymers*, 1995, V. 35(5), p. 419-433.
 204. Chang T.C., Yang Y.P., Huang K.H., Chang C.C., Hechst C. // Investigation of thionine-DNA interaction by satellite hole spectroscopy. *Opt. Spectrosc.* 2005, V. 98(5), p. 716-721.
 205. Paul P., Hossain M., Suresh Kumar G. // Biophysical studies on the base specificity and energetics of the DNA interaction of fotoactive dye thionine; spectroscopic and calorimetric approach. *Biophys. Che.*, 2010, V. 148(1-3), p. 93-103.
 206. Paul P., Suresh Kumar G. // Toxic interaction of thionine to deoxyribonucleic acids: Elucidation of the sequence specificity of binding with polynucleotides. *J. Hazzard mater*, 2010, V. 184, p. 620-626.
 207. Xu Y., Yang L., Ye X., He P., Fang Y. // Impedance-based DNA biosensor employing molecular beacon DNA as probe and thionine as charge neutralizer. *Electroanalysis*, 2006, V. 18(9), p. 873-881.
 208. Paul P., Suresh Kumar G. // Thionine interaction to DNA: Comparative

- spectroscopic studies on double stranded versus single stranded DNA. *J. Fluoresc.*, 2012, V. 22, p. 71-80.
209. Lee H.K., Lee M., Rah H.W., Lee N, Cho Y.H., Jeang J.B., Jung H.N., Yang W.S., Ryu G.H. // DNA chip evaluation as a diagnostic device. *Curr. Appl. Phys.*, 2005, N 5, p. 433-437.
 210. Domany E. // Analysis of DNA-chip and antigen-chip data: studies of cancer, stem cells and autoimmune diseases. *Comp. Phys. Common*, 2005, V. 169, p. 183-187.
 211. Mockler T.C., Chan S., Sundaresan A., Chen H., Jacobsen S.E., Ecker J.R. // Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics*, 2005, V. 85, p. 1-15.
 212. Lee T.M.-H., Hsing I.-M. // DNA-based bioanalytical microsystems for handheld device applications. *Anal. Chim. Acta*, 2006, V. 556, p. 26–37.
 213. Hartwig A., Mullenders L., Asmuss M., Dally H., Hartmann M. // Disruption of DNA repair processes by carcinogenic metal compounds. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1998, vol. 361, p. 377-380.
 214. Cote G.L., Lec R.M., Pishko M.V. // Emerging biomedical sensing technologies and their applications. *IEEE Sensors J.*, 2003, V. 3, p. 251-266.
 215. Zimmermann B., Hahnefeld C., Herberg F.W. // Applications of biomolecular interaction analysis in drug development. *TARGETS*, 2002, V. 1, p. 66-73.
 216. Erdem A., Ozsoz M. // Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions. *Electroanalysis*, 2002 V. 14, p. 965-974.
 217. Puja P, Soumya S. M., Subhash Ch. B., Gopinatha S. K. // Exploring the interaction of phenothiazinium dyes methylene blue, new methylene blue, azure A and azure B with tRNA^{Phe}: Spectroscopic, thermodynamic, voltammetric and molecular modeling approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, DOI: 10.1039/C6CP07888E.
 218. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Torosyan M.A., Karapetian A.T. // The Influence of

- GC/AT Composition on Intercalating and Semi-Intercalating Binding of Ethidium Bromide to DNA. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, v. 23, N 11, p. 2016-2020.
219. Wadkins R.M., Jares-Erijman E.A., Klement R., Rudiger A., Jovin T.M. // Actinomycin D binding to single-stranded DNA: Sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 1996. v. 262. p. 53-68.
220. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. // Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2008, v. 25, "6, p. 641-646.
221. Changlun T., Zhou H., Jianmin W. // Interaction Between Methylene Blue and Calf Thymus Deoxyribonucleic Acid by Spectroscopic Technologies. *Journal of Fluorescence*, 2010, v. 20, p. 261-267.
222. Lakowicz J.R. // *Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition*. Center for Fluorescence Spectroscopy University of Maryland School of Medicine Baltimore, MD 21201 USA, 2006, 954 p.
223. Համբարձումյան Լ.Ա. // ԴՆԹ-Ի հետ մեթիլեն կապույտի փոխազդեցության առանձնահատկությունները: Գ.00.02 Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսություն, Երևան, 2015, 119 էջ:
224. Antoniou T., Tseng A.L. // Interactions between recreational drugs and antiretroviral agents. *Annals of Pharmacotherapy*, 2002, V. 36(10), p. 1598-1613.
225. Круглова Е.Б., Гладковская Н.А., Малеев В.Я. // Использование метода спектрофотометрического анализа для вычисления термодинамических параметров связывания в системах актиномициновые производные-ДНК. *Биофизика*, 2005, т. 50, Вып. 2, с. 253-264.

226. Евдокимов Ю.М., Соляное В.И., Нечипуренко Ю.Д., Скуридин С.Г., Захаров М.А., Спенер Ф., Палумбо М. // Молекулярные конструкции (суперструктуры) на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот. Мол. Биология, 2003, т. 37, с. 340-355.
227. Jonson I.M., Bhuvan Kumar S.G., Malthi R. // De-intercalation of ethidium bromide and acridine orange by xanthine derivatives and their modulatory effect on anticancer agents: a study of DNA-directed toxicity enlightened by time correlated single photon counting. J. Biomol. Struct. & Dyn., 2003, V. 20, N 5, p. 677-685.
228. Сибирцев В.С. // Изучение возможностей применения к анализу ДНК бифункциональной системы: Бромид этидия + Хехст 33258. Биохимия, 2005, т. 70, вып. 4, с. 545-555.
229. Hajian R., Shams N., Mohagheghian M. // Study on the interaction between doxorubicin and deoxiribonucleic acid with the use of methylene blue as a prob. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009, V. 20, p. 1399-1405.
230. Karapetian A.T., Grigoryan Z.A., Mamasakhlisov Y. Sh., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O. // Theoretical treatment of helix-coil transition of complexes DNA with two different ligands having different binding parameters. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2015, V. 34, p. 198-202. doi:10.1080/07391102.2015.1010584.
231. Нечипуренко Ю.Д. // Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами: от действия лекарственных соединений до молекулярного конструирования и нанотехнологий. Институт компьютерных исследований. Москва-Ижевск, 2015, 187 стр.
232. Վարդևանյան Պ.Հ., Անտոնյան Ա.Պ. // Լիգանդների հավասարակշռական միացումը մակրոմոլեկուլների հետ: Ուսումնական ձեռնարկ, §Աստղիկ՝ հրատարակչություն, Երևան 2006:

233. Маршелл Э. // Биофизическая химия, в 2-х т., М.: Мир, 1981.
234. Эдсолл Дж., Гатфренд Х. // Биотермодинамика, М.: Мир, 1986.
235. Заседатгелев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. // Теория одномерной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере. Мол. Биол. 1971, т. 5, с. 245-290.
236. Гурский Г.В., Заседатгелев А.С., Волькенштейн М.В. // Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гомополимере. Мол. Биол. 1972, т. 6, с. 479-489.
237. Гурский Г.В., Заседатгелев А.С. // Точные соотношения, описывающие связывание регуляторных белков и других решеточных лигандов на двухспиральных полинуклеотидах. Биофизика, 1978, т. 23, с. 932-946.
238. Gursky G.V., Zasedatelev A.S. // Thermodynamic and stereochemical aspects of binding interactions between sequence-specific ligands and DNA. Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1984. V. 5, p. 53-139.
239. Гурский Г.В., Туманян В.Г., Заседатгелев А.С., Жузе А.Л., Гроховский С.Л., Гпттих Г.П. // Код, управляющий специфическим связыванием белков с ДНК и структура стереоспецифических участков регуляторных белков. Мол. Биол., 1975, т. 9, с. 635-651.
240. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. // Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. I. Неконтактные кооперативные взаимодействия. Мол. Биол. 1984, т. 18, с. 798-812.
241. Nechipurenko Yu.D., Gursky G.V. // Cooperative effects on binding of proteins to DNA. Bioph. Chem., 1986, V. 24, p. 195-209.
242. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. // Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. Биофизика, 2003, т. 48, с. 773-796.
243. Lando D.Yu., Fridman A.S., Haroutiunian S.G., Vardanyan V.I. // Representation of binding parameters for DNA-ligand complexes using two infinite series characterizing long-range ligand-ligand interactions along the

- double helix. Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus, 2006, V. 50, p. 46-50.
244. McGhee J.D., von Hippel P.H. // Theoretical Aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. J. Mol. Biol., 1974, V. 86, p. 469-489.
245. Grokhovsky S.L., Surovaya A.N., Burdhardt G., Pismensky V.F., Chernov B.K., Zimmer Ch., Gursky G.V. // DNA sequence recognition by bis-linked netropsin and Distamycin derivatives. FEBS Letter, 1998, V. 439, p. 346-350.
246. Wells G., Martin C.R., Howard P.W., Sands Z.A., Laughton C.A., Tiberghien A., Thurston D.E. // Design, synthesis and biophysical and biological evaluation of a series of pyrrolobenzodiazepine-poly(N-methylpyrrole) conjugates. Journal of Medicinal Chemistry, 2006, V. 49, N 18, p. 5442-5461.
247. Рябоконт В.Ф., Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. // Количественные методы анализа диаграмм футпринтинга для комплекса лиганда с ДНК с известной последовательностью. ДАН, 2004, т. 398, с. 832-837.
248. Нечипуренко Ю.Д. // Анализ связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами. Биофизика, 2014, т. 59, с. 12-36.
249. Карка M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R.E. // The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. PNAS, 1985, V. 82, p. 1376-1380.
250. Hill T.L. // Thermodynamics of small systems. Dover, New York, 1994.
251. Hill T.L. // Perspective nanothermodynamics. Nano Letters, 2001, V. 1, p. 111-112.
252. Hill T.L. // A different approach to nanothermodynamics. Nano Letters, 2001, V. 1, p. 273-275.
253. Schwarz G. // On the analysis of linear binding effects associated with curved Scatchard plot. Biophys. Chem., 1977, V. 6, p. 65-76.
254. Schwarz G., Stankovsky S. // Linear cooperative binding of large ligands involving mutual exclusion of different binding modes. Biophys. Chemistry,

- 1979, V. 10, p. 173-181.
255. Schwarz G. // A universal thermodynamic approach to analyze biomolecular binding experiments. *Biophys. Chem.*, 2000, V. 86, p. 119-129.
256. Reiter J., Epstein I.R. // Cooperative lattice ligand binding approximate Gaussian binding distribution. *Biophys. Chem.*, 1989, V. 33, p. 1-9.
257. Wolfe A.R., Meehan T. // Use of binding site neighbor-effect parameters to evaluate the interactions between adjacent ligand on a linear lattice. Effects on ligand-lattice association. *J. Mol. Biol.*, 1992, V. 223, p. 1063-1087.
258. Lohman T.M., Masootti D.P. // Thermodynamics of ligand-nucleic acids interactions. *Methods in Enzymology*, 1992, V. 212, p. 400-424.
259. Evans J.W. // random and cooperative sequential adsorption. *Rev. Mod. Phys.*, 1993, V. 65, p. 1281-1329.
260. Krapivsky P.L., Benaïm E. // Collective of adsorption –desorption processes. *J. Chem. Phys.*, 1994, V. 100, p. 6778-6782.
261. Sroff H.A. // Energetics of protein-DNA interactions – an exact calculation for binding of ligands to a lattice of overlapping sites. *Biopolymers*, 1995, V. 36, p. 121-134.
262. DiCera E., Korg Y. // Theory of multivalent binding in one and two-dimensional lattices. *Biophys. Chem.*, 1996, V. 61, p. 107-124.
263. Korg Y. // Ligand binding on a ladder lattice. *Biophys. Chem.*, 1999, V. 81., p. 7-21.
264. Munro P.D., Jackson C.M., Wirz D.J. // Consequences of the non-specific binding of a protein to a linear polymer: reconciliation of a stoichiometric and equilibrium titration data for the trombin-heparin interaction. *J. Theor. Biol.*, 2000, V. 203, p. 407-418.
265. Torralba A.S., Colmenarejo G., Montero F. // Sequence distribution and intercooperativity detection for two ligands simultaneously binding to DNA. *Biopolymers*, 2001, V. 58, p. 562-576.

266. Tsadikov O.V., Holbrook J.A., Shkel I.A., Record MT Jr. // Analytic binding isotherms describing competitive interactions of a protein ligand with specific and nonspecific sites on the same DNA oligomer. *Biophys. J.*, 2001, V. 81, p. M1960-1969.
267. Teif V.B., Haroutiunian S.G., Vorob'ev V.I., Lando D.Y. // Short-range interactions and size of ligands bound to DNA strongly influence adsorptive phase transition caused by long-range interactions. *J. Biomol. Struct. and Dynamics*, 2002, V. 19, N. 6, p. 1093-1100.
268. Poland D. // Ligand binding distribution in biopolymers. *J. Chem. Phys.*, 2000, V. 113, p. 4774-4784.
269. Marques M.A., Doss R.M., Foister S., Dervan P.B. // Expanding the repertoire of heterocycle ring pairs for programmable minor groove DNA recognition. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, V. 126, p. 10339-10349.
270. Fechter E.J., Olenyuk B., Dervan P.B. // Design of a sequence-specific DNA bisintercalator. *AngewChemIntEdEngl.* 2004, V. 43, p. 3591-3594.
271. Костюков В.В., Евстигнеев М.П. // Энергетика комплексообразования биологически активных соединений и нуклеиновых кислот в водном растворе. Севастополь, СевНТУ, 2012, с. 475.
272. Krylov A.S., Zasedatelev A.S., Grokhovsky S.L., Zhuze A.L., Gursky G.V. Gottich B.P. // Quantitative estimation of the contribution of pyrrolcarboxamide groups of the antibiotic distamycin A into specificity of its binding to DNA AT pairs. *Nucl. Acids Res.*, 1978, V. 6, p. 289-304.
273. Crothers D.M. // Calculation of binding isotherms for heterogenous polymers. *Biopolymers*, 1968, V. 6, p. 575-584.
274. 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.

275. 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, V. 68, p. 48-55.
276. Chu X., Shen G.L., Jiang J.H., Kang T.F., Xiong B., Yu R.Q. // Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications. *Anal. Chim. Acta*, 1998, v. 373, p. 29.
277. Ibrahim M.S. // Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications. *Analytica Chimica Acta*, 2001, v. 443, p. 63-72.
278. Qu Feng, Nan-Qiang Li, Yu-Yung Jiang // Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA. *Analytical Chim. Acta*. 2001, v. 344, p. 97-104
279. Xinhui H., Wang Q., Pingang H., Fang Y. // Spectroelectrochemistry study on the electrochemical reduction of ethidium bromide. *Analytical Sciences*. 2002, v. 18, p. 645-650.
280. 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.
281. 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.
282. Wall P., Paoletti C., Le-Pecq J.B. // Decay of fluorescence emission anizotropy of the ethidium bromide-DNA complex. Evidence for an internal motion in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1970, V. 65, N 2, p. 417-421.
283. Burns V.W.F. // Fluorescence polarization characteristics of the complex between ethidium bromide and rRNA, tRNA and DNA. *Archives Biochem.*

- Biophys., 1971, V. 145, N 1, p. 248-254.
284. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. // Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions. J. Biomol. Struct. & Dyn., 2000, v. 18, N 2, p. 231-235.
285. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Hovhannisyan 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 (11 pages). World Scientific Publishing Company, Doi: 10.1142/S0217984914501784.
286. Тищенко Е. И., Карапетян А.Т., Борисова О.Ф. // Гетерогенные комплексы бромистого этидия их и роль в стабилизации (dA)_n-(dT)_n структур. 1996, т. 30, N 6, с. 1970-1377.
287. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Минасянц М.В. // Спектры поглощения и флуоресценции комплексов полинуклеотидов с бромистым этидием. Известия НАН Армении, 2015, Физика, т. 50, N 4, с. 511-519.
288. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. // Complex-formation of ethidium bromide with with poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]. J. Biomol. Struct. and Dynam., 2005, V. 22, N 4, p. 465-470.
289. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. // Связывания бромистого этидия с одноцепочечной ДНК. Биофизика, 2003, т. 48(4), с. 644-647.
290. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. // Комплексообразование бромистого этидия с одноцепочечным некоплементарным дезокси тетрануклеотидом 5'-d(ApApGpC). Молекулярная биология, 1997, т. 31, N 2, с. 263-273.
291. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. // Термодинамика взаимодействия

- ароматического лиганда с одноцепочечной ДНК: анализ комплексообразования бромистого этидия с некоплементарными изомерными дезокситетрануклеотидами 5'-d(CGAA) и 5'-d(AAGC) по данным ¹H-ЯМР. Биополимеры и клетка, 1997, т. 13, с. 100-107.
292. 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.
293. Sun X., Cao E., Yujian H., Qin J. // Fluorescence studies on the interaction of ethidium bromide with duplex, triplex and quadruplex DNA structures. Science in China (Series B), 1999, V. 42, N 1, p. 62-69.
294. Searle M.S., Embrey K.J. // Sequence-specific interaction of Hoechst 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by ¹H NMR spectroscopy. Nucleic Acids Res. 1990, V. 18, p. 3753-3762.
295. Lai Sh., Chang X., Tian L., Bai Yu., Zhai Yu. // Fluorometric determination of DNA using nano-SiO₂ particles as an effective dispersant and stabilizer for acridine orange. Microchim. Acta, 2007, V. 156, p. 225-230. DOI 10.1007/s00604-006-0669-8.
296. Tzyh-Chyang Tang, Hsuan-Jung Huang // Electrochemical Studies of the Intercalation of Ethidium Bromide to DNA. Electroanalysis, 1999, V. 11, N.16, p.1185-1190.