

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԹՈՐՈՍՅԱՆ ՄԱՐԳԱՐԻՏԱ ԱՆԴՐԵՅԻ

ՀԱՐԹ ՔՐՈՍՄՈՖՈՐՈՎ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՆՈՒՎԼԵԻՆԱԹՈՒՆԵՐԻ ՀԵՏ

Գ.00.02 «Կենսաֆիզիկա և կենսաինֆորմատիկա» մասնագիտությամբ
ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների թեկնածուի զիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2018

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ТОРОСЯН МАРГАРИТА АНДРЕЕВНА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИГАНДОВ С ПЛОСКИМ ХРОМОФОРОМ С
НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук
по специальности
03.00.02 “Биофизика и биоинформатика”

ЕРЕВАН 2018

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ա.Թ. Կարապետյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ե.Բ. Դալյան

Առաջատար կազմակերպության՝

քիմ.գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Կ.Ռ. Գրիգորյան

ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային գիտակրթական
կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2018թ. հունիսի 8-ին ժամը 14⁰⁰-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՂ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փողոց 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է մայիսի 7-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

Ս.Ա.Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор физ.-мат. наук, профессор
А.Т. Карапетян

Официальные оппоненты:

доктор физ.-мат. наук, профессор
Е.Б. Далян

доктор хим. наук, профессор
К.Р. Григорян

Ведущая организация

Международный научно-
образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 8-го июня в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукиана 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 7-го мая.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Одной из основных задач современной молекулярной биофизики является исследование особенностей взаимодействия низкомолекулярных биологически активных соединений - лигандов с нуклеиновыми кислотами (НК). Актуальность данного вопроса обусловлена тем, что многие антибиотики, канцерогены, мутагены оказывают свое действие путем прямого взаимодействия с нуклеиновыми кислотами (НК) (Chaires, 2008). Выяснению структуры, термодинамики и природы взаимодействия НК с биологически активными веществами посвящено огромное количество экспериментальных и теоретических работ (Карапетян et al., 1998, Chaires, 2008), где подробно представлены результаты исследований основных закономерностей, характеризующих взаимодействие различных лигандов с НК.

Среди этих лигандов особое место занимает противоопухолевый антрациклиновый антибиотик – митоксантрон, содержащий плоский хромофор с присоединенной к нему алифатической группой. Взаимодействие митоксантрона с ДНК исследовано сравнительно хорошо (Agarwal, et al, 2013), в то время как взаимодействие этого лиганда с РНК (А-форма), а также с неканоническими формами НК (Z-форма, квадруплексы) практически не изучено. Известно, что структурные параметры неканонических форм НК существенно отличаются от параметров В-формы, и поэтому такое отличие может иметь принципиальное значение в процессе комплексообразования митоксантрона с этими НК. Важным является также исследование совместного взаимодействия плоский хромофор содержащих лигандов с НК. Этот вопрос особенно важен с той точки зрения, что НК в клетке окружены различными соединениями, которые с ними могут связываться совместно как одинаковыми, так и различными механизмами.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является изучение взаимодействия интеркалятора митоксантрона с двухцепочечными, четырехцепочечным poly(G) (квадруплекс) полирибонуклеотидами, определение термодинамических параметров комплексообразования, исследование совместного связывания интеркалирующих соединений митоксантрона и бромистого этидия (БЭ) с НК, а также учитывая уникальное строение митоксантрона и отличие его структуры от других интеркаляторов, выяснение его влияния на В→Z равновесие.

Для осуществления поставленных целей сформулированы следующие основные задачи исследования:

- методом спектрофотометрии исследовать взаимодействие митоксантрона с двухцепочечными ДНК, синтетическими полирибонуклеотидами - poly(G)·poly(C) и poly(A)·poly(U) при различных ионных силах раствора и при разных температурах и сравнить полученные данные с данными взаимодействия БЭ с полирибонуклеотидами,
- исследовать связывание митоксантрона с четырехцепочечной структурой poly(G),

- исследовать совместное связывание митоксантрона и БЭ с НК. Получить параметры плавления комплексов тройных систем митоксантрон - НК - БЭ.
- выяснить избирательность взаимодействия митоксантрона с АТ и GC парами;
- изучить особенности В→Z перехода в присутствии митоксантрона.

Для эффективного решения этих задач исследования осуществлялись экспериментальными методами спектродетекции в видимой и ультрафиолетовой области спектра и кругового дихроизма.

Научное значение и новизна. В работе впервые исследовано взаимодействие митоксантрона с двухцепочечными, четырехцепочечными полирибонуклеотидами и совместного связывания митоксантрона и БЭ с НК. Получены параметры плавления комплексов тройных систем митоксантрона-НК-БЭ. Определены термодинамические параметры и избирательность связывания митоксантрона с АТ, АU и GC парами оснований, и полученные результаты сравнивались с аналогичными данными, полученными при связывании БЭ с полирибонуклеотидами. Изучено влияние митоксантрона на В→Z переход.

На защиту выносятся следующие основные положения диссертации

1. Экспериментально определенные значения термодинамических параметров связывания митоксантрона с двухцепочечными и четырехцепочечными полирибонуклеотидами при помощи спектров поглощения комплексов.
2. Выявленные избирательности связывания лигандов с GC и АТ основаниями из дифференциальных кривых плавления ДНК с блочной гетерогенностью.
3. Результаты экспериментальных исследований по одновременному взаимодействию митоксантрона и БЭ с дуспиральными НК.
4. Выявленные особенности влияния митоксантрона на В→Z переход в молекулах poly(dG-dC)·poly(dG-dC) при увеличении ионной силы раствора выше 2.5M.

Научная и практическая ценность работы. В настоящее время противоопухолевые антрациклиновые препараты, к которым относится митоксантрон, широко применяются в клинической химиотерапии. Этот лиганд, проникая в клетку, избирательно накапливается там и, связываясь с дуплексами ДНК, препятствует процессу репликации и транскрипции. В работе впервые исследовано взаимодействие митоксантрона с многоцепочечными структурами НК и определены их термодинамические параметры комплексообразования. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для составления более эффективных схем применения, разработки новых противоопухолевых лекарственных препаратов и экспресс анализа их молекулярного действия. В частности, эти данные также дополняют существующий в настоящее время пробел в исследованиях взаимодействия лигандов-интеркаляторов с рибонуклеиновыми кислотами.

Полученные научные результаты могут быть использованы в лекционных курсах биологического и физического факультетов ЕГУ, а также специалистами, занимающимися химиотерапией опухолей в медицинских лабораториях и учреждениях.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертационной работы представлены на International workshop on ionizing and non-ionizing radiation influence on structure

and Biophysical properties of living cells (Tsaghkadzor, Armenia, 2015), Conversation on Voimolecular Stereodynamics (Albany, USA, 2013, 2015) а также на семинарах кафедры Физики и электротехники НУАСА и кафедры биофизики ЕГУ.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 9 научных работ.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов.

Работа изложена на 118 стр. машинописного текста, включающего 5 таблиц, 37 рисунков и списка литературы, насчитывающего 114 наименований.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы, сформулирована цель работы, показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первой главе, являющейся обзором литературы, кратко изложены литературные данные о структуре и конформационных переходах нуклеиновых кислот. Обсуждены особенности и структурные отличия канонических А-, В- и неканонических Z-, Н-форм, триплексов и G-квадруплексов НК.

Во второй главе приведены материалы и методы исследований. Применен метод УФ-плавление комплексов НК-лиганд. Для получения кривых плавления использовался непрерывный режим нагрева раствора НК и комплексов с лигандами. Нагрев осуществлялся со скоростью $\sim 0,25$ град. мин⁻¹. Измерения проводились в интервале температур от 25 до 95°C. Кривые плавления каждого образца снимались 6-7 раз. Спектры поглощения и кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP 8-100 (Англия). Спектры кругового дихроизма (KD) получены в институте Молекулярной Биологии НАН РА на дихрографе Jobin Ivon Mark III.

В работе были использованы следующие препараты НК: ультрачистые ДНК М. Lysodeikticus и тимуса телянка ("Sigma"), poly(A)·poly(U), poly(G) и poly(C) ("Pharmacia"). а также БЭ, митоксантрон (Рис. 1), (фирмы "Sigma") США. Двуспиральный полирибонуклеотид poly(G)·poly(C) был приготовлен нагреванием раствора смеси poly(G) и poly(C) в эквимольных количествах

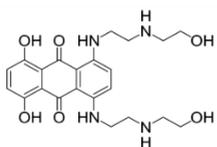


Рис. 1. Химическая формула митоксантрона.

Исследования проводились в водно - солевом растворе, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М Трис, 0,5 mM ЭТДА pH=7,4 (буфер А) и 0,01 М NaCl, 1 mM Трис, 0,5 mM ЭТДА pH=7,4 (буфер В). Все фирменные препараты НК использовались без дополнительной очистки. Для ДНК соотношение A_{260}/A_{280} составляло 1.8-1.9, а A_{260}/A_{230} -2.2-2.4, что свидетельствовало о чистоте препарата.

Использовались следующие коэффициенты экстинкции: для митоксантрона $\epsilon_{659}=25090$ М⁻¹см⁻¹л, для БЭ $\epsilon_{480}=5800$ М⁻¹см⁻¹л, ДНК тимуса телянка $\epsilon_{260}(p)=6550$ М⁻¹см⁻¹л, ДНК М. Lysodeik. $\epsilon_{260}(p)=6800$ М⁻¹см⁻¹л, poly(A)·poly(U) $\epsilon_{260}(p)=7140$ М⁻¹см⁻¹л, poly(G)·poly(C) $\epsilon_{260}(p)=7900$ М⁻¹см⁻¹л.

Определение термодинамических параметров связывания лигандов с НК. Значение константы связывания и стехиометрия насыщения НК лигандами рассчитаны из кривых связывания, построенных на основании спектров поглощения лиганда и его комплексов с НК. Для расчета из спектрофотометрических кривых титрования по формулам (1) определяли концентрации свободного (c_f) и связанного (c_b) лигандов и была построена изотерма адсорбции в координатах Скэтчгарда.

$$\frac{c_f}{c_0} = \frac{A - A_b}{A_f - A_b} \quad \text{и} \quad c_b = c_0 - c_f \quad (1)$$

где A_f и A_b – поглощения свободных и связанных молекул лигандов при длине волны максимума поглощения свободного лиганда, A – поглощение при промежуточных концентрациях лигандов. A_b была определена из линейной экстраполяции зависимости A от $1/c_p$ при $1/c_p \rightarrow 0$. Связывание лигандов с НК характеризуется нелинейной изотермой адсорбции, которую можно описать с помощью формул

$$\frac{r}{c_f} = K(1 - nr) \left(\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right)^{n-1} \quad (2)$$

$$\frac{r}{c_f} = K(1 - nr) \left[\frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right]^{n-1} \cdot \left[\frac{1 - (n+1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2 \quad (3)$$

где $r = \frac{c_b}{c_p}$, K – константа связывания, n – параметр характеризующий стехиометрию

комплекса НК-лиганд при насыщении и равный числу пар оснований НК, занимаемых одной связанной молекулой лиганда, ω – параметр, характеризующий антикооперативность, а параметр $R = \{[1 - (n+1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr)\}^{\frac{1}{2}}$.

Используя значение K , определялось изменение свободной энергии Гиббса – ΔG по формуле (4)

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Изменение энтропии ΔS и энтальпии ΔH для лиганд-НК комплексообразования можно рассчитать по стандартной формуле (5)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (5)$$

С учетом выражений (4) и (5)

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

Согласно выражению (6), если зависимость $\ln K$ от $\frac{1}{T}$ линейная, то тангенс угла прямой, образованной с осью абсцисс равен величине $-\frac{\Delta H}{R}$, а ордината точки пересечения прямой с осью ординат есть величина $\frac{\Delta S}{R}$, откуда определяются значения энтальпии ΔH и энтропии ΔS комплексообразования.

Результаты и обсуждение

В третьей главе приведены результаты исследования и их обсуждения, которые изложены ниже.

Изучение взаимодействия митоксантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами poly(G)·poly(C) и poly(A)·poly(U).

Низкомолекулярные биологически активные соединения, содержащие плоские, ароматические кольца, как например митоксантрон (Рис. 1), связываются с НК, интеркалируя между соседними парами оснований. Титрование полирибонуклеотидами при постоянной концентрации лиганда показало, что спектры поглощения в видимой области изменяются, отражая связывание лиганда с НК (НК в видимой области спектра не поглощают) (Рис. 2). Из Рис. 2 следует, что при постоянной концентрации митоксантрона, с увеличением содержания poly(G)·poly(C) наблюдается гипохромизм и смещение максимума поглощения при 665 нм в сторону длинных волн, что характерно для интеркаляции (Nafisi, 2007). С некоторых значений c_p/c_0 прекращаются дальнейшие изменения поглощения (все молекулы митоксантрона находятся в связанном состоянии), которое представляет значение Ав. В этих случаях по формуле (1) можно вычислить c_b и c_f и построить изотерму адсорбции в координатах Скэтчарда. Методом наименьших квадратов построилась изотерма связывания, которую можно описать теоретической зависимостью (2). Полученные таким образом кривые позволили определить параметры К и n, характеризующие связывание митоксантрона с poly(G)·poly(C) (Таблица 1). В случае титрования poly(G)·poly(C) насыщение происходит, когда концентрация полирибонуклеотида приблизительно на два порядка больше концентрации митоксантрона.

Получены также данные в случае взаимодействия митоксантрона с poly(A)·poly(U) (Таблице 1), из которой следует, что наблюдается избирательность

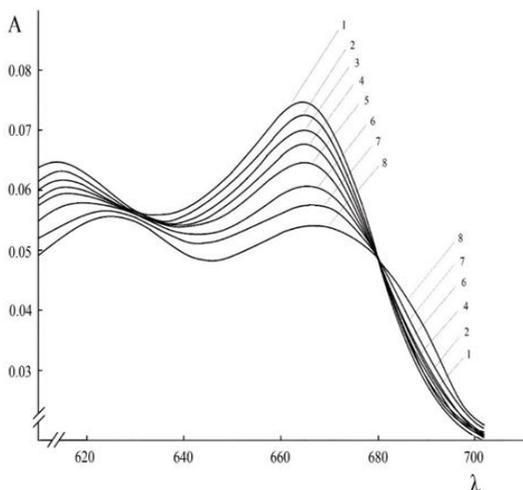


Рис. 2. Спектры поглощения комплексов митоксантрон-poly(G)·poly(C). В процессе титрования концентрация митоксантрона оставалась постоянной ($c_0=3.0 \cdot 10^{-6}M$). Концентрация полирибонуклеотида $c_p=0$ (1), $1.55 \cdot 10^{-5}M$ (2), $4.8 \cdot 10^{-5}M$ (3), $9.1 \cdot 10^{-5}M$ (4), $1.25 \cdot 10^{-4}M$ (5), $2.1 \cdot 10^{-4}M$ (6), $2.67 \cdot 10^{-4}M$ (7), $3.82 \cdot 10^{-4}M$ (8): $\mu=0.11 M NaCl, t=35^{\circ}C$

связывания митоксантрона с GC и AU парами. Константа связывания митоксантрона с poly(G)·poly(C) в 3 раза больше, чем константа связывания митоксантрона с poly(A)·poly(U). Следует отметить, что при связывании классического интеркалятора

БЭ (который в отличие от митоксантрона содержит циклическую боковую группу, присоединенную к плоскому хромофору) с полирибонуклеотидами наблюдается противоположное соотношение для избирательности связывания с GC и AU парами основания. Сравнение данных приведенных в Таблице 1 с литературными, свидетельствует, что значение n для комплексов РНК-митоксантрон составляет $n=6-8$, что в 3-4 раз превышает значение n для комплексов ДНК-митоксантрон ($n=2-3$) (Agarwal, et al, 2013), а константа связывания в случае РНК – митоксантрон почти на порядок меньше, чем в случае ДНК.

Таблица 1

Константа связывания K и число мест связывания n для комплексов митоксантрона с полирибонуклеотидами при трех температурах. $\mu = 0,1 \text{ M NaCl}, \text{pH} = 7,4$

полирибонуклеотид	t, °C	$K \times 10^{-4}, \text{M}^{-1}$	$-\Delta G$ ккал/мол	n
poly(G)·poly(C)	35	9,9±0,7	7,2±0,1	6,0±0,2
	50	6,2±0,9	7,1±0,1	6,5±0,3
	60	3,4±0,6	6,9±0,1	6,6±0,4
poly(A)·poly(U)	25	6,8±0,3	6,6±0,1	7,8±0,4
	30	5,2±0,3	6,6±0,1	8,0±0,4
	35	3,0±0,4	6,4±0,1	8,2±0,5
poly(G)	17	77,5±0,1	7,8±0,1	10,2±0,3
	27	58,0±0,2	7,9±0,1	10,3±0,2
	37	43,4±0,1	8,0±0,1	10,1±0,4

Возможно, разница в значениях параметров, характеризующих интеркаляционное связывания митоксантрона с двуспиральными ДНК и полирибонуклеотидами обусловлена тем, что ДНК в исследуемых условиях находится в В-форме, а полирибонуклеотиды в А-форме, геометрия спирали, гидратация и плотность заряда которых существенно отличаются друг от друга.

Взаимодействие митоксантрона с poly(G). Взаимодействие митоксантрона с $[\text{poly(G)}]_4$ исследовали спектрофотометрически при ионной силе $\mu=0.11 \text{ M NaCl}$. Выбор такой концентрации соли связан с тем, что poly(G) при концентрациях NaCl больше 0.01 M, образует четырехцепочечную структуру (квадруплекс) (Vorlickova, et al, 2012). Эксперименты показали, что при связывании митоксантрона с $[\text{poly(G)}]_4$ в этих условиях наблюдаются аналогичные закономерности, что и при его связывании с двуцепочечными полирибонуклеотидами. Получены кривые титрования и построены изотермы адсорбции, при помощи которых были определены K и n (Таблица 1). Данные, приведенные в Таблице 1 показывают, что для комплексов митоксантрон- $[\text{poly(G)}]_4$ $n \cong 10$ и $K \cong 4,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (при 37°C), что сильно отличаются от соответствующих параметров для комплексов митоксантрон-poly(G)·poly(C) (Таблица

1). Мы предполагаем, что это связано с плотной упаковкой полинуклеотида в структуре квадруплекса.

Исследование избирательности связывания митоксантрона с АТ и GC парами оснований.

Обычно при исследовании избирательности связывания различных лигандов с АТ- и GC-нуклеотидными парами эксперименты проводятся с ДНК из различных источников с различным GC- содержанием. Поэтому исследованы параметры связывания митоксантрона с ДНК тимуса телянка и *M. lysodeikticus*, GC- содержание которых соответственно равны 42% и 72%. Связывание митоксантрона с ДНК исследовали по характеру изменения спектров поглощения комплексов в видимой области спектра. Расчеты, проведенные с помощью формул (1) и (2) для К и n, дают следующие значения при 35°C для ДНК тимуса телянка и *M. lysodeikticus* соответственно: $K \approx 5.2 \times 10^5 M^{-1}, n \approx 2,4$ и $K \approx 6.7 \times 10^5 M^{-1}, n \approx 2,8$. В ряде случаев различия между термодинамическими параметрами могут быть незначительными и находиться в пределах ошибки эксперимента. В нашем случае разница между параметрами взаимодействия митоксантрона с ДНК тимуса телянка и *M. lysodeikticus* незначительна. Поэтому, в экспериментах по определению специфичности взаимодействия лигандов с АТ- и GC-нуклеотидными парами нами проведены исследования с одной и той же ДНК с блочной гетерогенностью. Интегральная кривая плавления гетерогенной ДНК тимуса телянка не гладкая, и ее дифференциальную кривую плавления (ДКП) можно однозначно разложить на 5 гауссовых составляющих. Максимумы этих составляющих соответствуют температуре плавления T_m этого блока. При помощи T_m можно определить GC-содержание этого блока. Связывание митоксантрона с этими участками приводит к сдвигу T_m в сторону высоких температур и на основе полученных данных можно судить об избирательности связывания этого лиганда с определенными парами ДНК.

На Рис. 3 приведены зависимости T_m от относительной концентрации митоксантрона для блоков ДНК тимуса телянка с различным GC-содержанием. Видно что, увеличение T_m гораздо сильнее для GC-богатых блоков (ср. кривая 3 с 1). Из Рис. 3 следует также, что наклон кривой T_m от r намного сильнее зависит от GC- содержания, причем с увеличением последней увеличивается тангенс угла наклона. Вероятнее

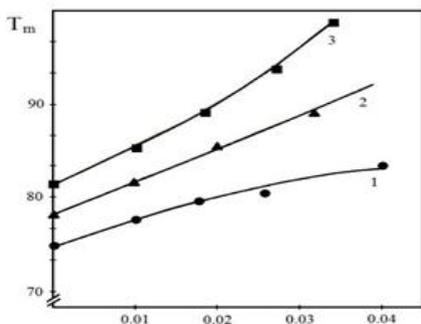


Рис. 3. Зависимость температуры плавления составляющих ДКП ДНК с GC-содержанием 0,5(1); 0,58 (2) и 0,66 (3) от относительной концентрации лиганда (r).

всего, это обусловлено тем, что в зависимости от концентрации лиганда, механизмы взаимодействия митоксантрона с АТ- и GC-парами отличаются друг от друга. Таким образом, обобщая выше приведённые экспериментальные данные и сравнивая их с литературными данными (Awashi, et al., 2013), можно заключить, что предложенный подход имеет определённые преимущества по сравнению с другими методами, так как не требует проведения экспериментов с ДНК с разным GC-содержанием и избирательности взаимодействия лигандов с АТ- и GC-нуклеотидными парами можно выявить непосредственно из прямого эксперимента на гетерогенной ДНК.

Специфичность можно выявить и другим способом, регистрируя спектры поглощения комплексов ДНК-лиганд. Как показали эксперименты и теоретические расчёты, гиперхромный эффект при конформационном переходе спираль-клубок на любой длине волны находится в линейной зависимости от нуклеотидного состава ДНК. Предполагая, что вклад АТ- и GC-пар в гиперхромность аддитивен, изменение поглощения ДНК-митоксантрон можно представить в виде:

$$\Delta A_{i,j} = \beta_{AT,i} \cdot f_{AT,j} + \beta_{GC,i} \cdot f_{GC,j} \quad (7)$$

где $f_{AT,j}$ и $f_{GC,j}$ - доля расплавленных АТ- и GC- пар соответственно при температуре j , $\Delta A_{i,j}$ - изменение поглощения при длине волны i и температуре j ($\Delta A_{i,j} = A_{i,j} - A_{i,0}$ где индекс 0 - соответствует температуре, при которой ДНК находится полностью в двуспиральном состоянии).

Из уравнения (7) были вычислены значения $f_{GC,j}$ и $f_{AT,j}$ при некоторых относительных концентрациях митоксантрона. Для нахождения этих величин использован метод наименьших квадратов. Представим величину Q в виде

$$Q = \sum_{i=1}^n [\Delta A'_{i,j} - (f_{AT,j} \beta_{AT,i} + f_{GC,j} \beta_{GC,i})]^2 \quad (8)$$

где $\Delta A'_{i,j}$ - экспериментальные значения изменения поглощения комплексов ДНК-митоксантрон при длине волны i и температуре j в области плавления ДНК. Определение минимума величины Q относительно $f_{AT,j}$ и $f_{GC,j}$, для каждой температуры j получаем систему линейных уравнений.

$$f_{AT,j} \sum_{i=1}^n \beta_{AT,i}^2 + f_{GC,j} \sum_{i=1}^n \beta_{AT,i} \beta_{GC,i} = \sum_{i=1}^n \Delta A'_{i,j} \beta_{AT,i} \quad (9)$$

$$f_{AT,j} \sum_{i=1}^n \beta_{AT,i} \beta_{GC,i} + f_{GC,j} \sum_{i=1}^n \beta_{GC,i}^2 = \sum_{i=1}^n \Delta A'_{i,j} \beta_{GC,i}$$

Из уравнений (9) можно вычислить долю расплавленных АТ- и GC-пар оснований (f_{AT} и f_{GC}) при каждой температуре (j) в области перехода спираль-клубок. Для исследования избирательности влияния митоксантрона на АТ- и GC- нуклеотидные пары, из полученных $f_{AT}(T)$ и $f_{GC}(T)$ зависимостей были вычислены температуры (T_{AT}, T_{GC}) в точке, где доля расплавленных АТ- и GC-пар оснований равна 0,5.

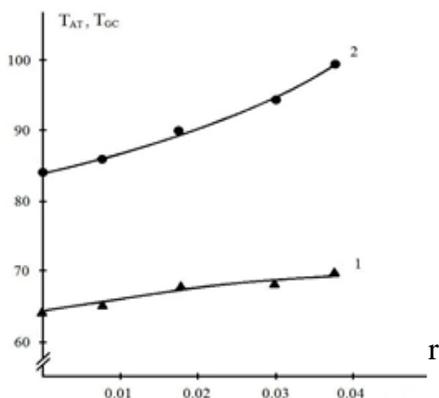


Рис. 4. Зависимость температуры плавления АТ (1) и GC (2) участков ДНК от относительной концентрации митоксантрона в растворе.

Учитывая полученные результаты, были построены зависимости T_{AT} и T_{GC} от концентрации митоксантрона (Рис.4). Из Рис. 4 следует, что с увеличением концентрации митоксантрона термостабильность АТ - и GC-пар оснований увеличивается. С увеличением концентрации митоксантрона разность $T_{GC}([\text{митоксантрон}]) - T_{AT}([\text{митоксантрон}])$ возрастает нелинейно, которое является следствием того, что при связывании митоксантрона с ДНК термостабильность GC-богатых участков увеличивается больше, чем термостабильность АТ-богатых участков: наблюдается избирательность связывания митоксантрона с нуклеотидными парами ДНК.

Особенности В \rightleftharpoons Z перехода в poly(dG-dC)·poly(dG-dC) полинуклеотиде в присутствии митоксантрона. Митоксантрон содержит симметричные боковые группы, которые с большой вероятностью, препятствуют обычной форме интеркаляции его в poly(dG-dC)·poly(dG-dC), которая может существенно отличается от взаимодействия с этим синтетическим полинуклеотидом классических интеркаляторов БЭ и акридинового оранжевого.

Известно, что poly(dG-dC)·poly(dG-dC) полностью переходит в Z-форму, когда концентрация NaCl больше 2.5 М (Pohl et al., 1972). В случае, когда все центры связывания полимера заняты интеркаляторами (дауномицин, БЭ), то В \rightarrow Z переход не наблюдается даже при увеличении концентрации NaCl до 4 М. С другой стороны, наши эксперименты показывают, что poly(dG-dC)·poly(dG-dC) находится в Z-форме, добавление митоксантрона не приводит к заметным изменениям спектров КД, которые обусловлены уникальностью строения этого лиганда (БЭ стабилизирует В-конформацию, а митоксантрон, располагаясь в малом желобке, изменяет структуру связывающего места и не препятствует В \rightarrow Z переходу). В настоящее время общепринято, что процесс интеркаляции приводит к такому изменению геометрии мест связывания полимера, которое не препятствует переходу (Dogra et al., 2014, Li N., et al., 2005). Экспериментальные данные показывают справедливость такого

предположения: митоксантрон затрудняет В→Z переход (Рис 5, кривая 2) стимулированный NaCl в молекулах poly(dG-dC)·poly(dG-dC), но не ингибирует, в отличие от БЭ (Рис 5, кривая 3). Такое действие митоксантрона связано с встраиванием плоского хромофора в плоскость между соседними нуклеотидами одной из нитей дц-полинуклеотида. Этот тип интеркаляции отличается от аналогичного

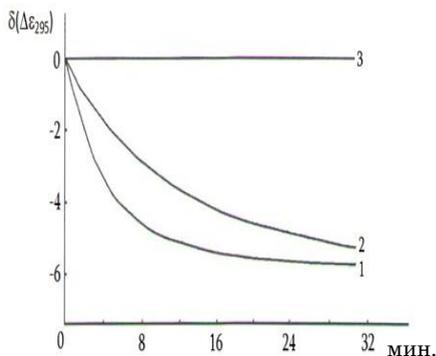


Рис. 5. Зависимость изменения $\Delta\epsilon_{295}$ от времени при В→Z переходе, стимулированном высокими концентрациями NaCl.

(1) poly(dG-dC)·poly(dG-dC) полинуклеотид, (2) комплекс poly(dG-dC)·poly(dG-dC) -митоксантрон, (3) комплекс poly(dG-dC)·poly(dG-dC)-БЭ после 40 минут добавления в раствор 3М NaCl.

связывания БЭ с дц-НК. Изменения электрохимических и спектральных характеристик при взаимодействии митоксантрона с ДНК позволяют утверждать, что только А и В кольца митоксантрона интеркалируют в спиральную структуру биополимера. Предполагается, что сильное искажение геометрии правоспиральной формы в малом желобке может стимулировать образование левой конформации в локальном месте связывания.

Определение термодинамических параметров комплексобразования митоксантрона с А- и В-формами НК.

Титрование, проведенное при разных температурах (в этих условиях НК образует двуспиральную или четырехцепочечную структуру), дала возможность определить изменение свободной энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) системы, которые вычислены при трех температурах зависимостей $\ln K$ от $1/T$ (Таблице 2).

Для сравнения в Таблице 2 приведены также термодинамические параметры связывания митоксантрона, а также классического интеркалятора БЭ с двуспиральными ДНК и полирибонуклеотидами, определенных при помощи формул (1)-(6).

Сравнение термодинамических параметров связывания митоксантрона с двуспиральными ДНК и полирибонуклеотидами показало, что для всех комплексов

свободная энергия G и энтальпия H изменяются аналогичным образом. Так как при интеркаляции митоксантрона геометрия А- и В-форм спирали изменяется по-разному, вследствие этого и энтропия связывания изменяется по-разному (Таблица 2). Данные Таблицы 2 показывают, что термодинамические параметры связывания БЭ сильно отличаются от соответствующих параметров для комплексов митоксантрона-НК. При связывании БЭ с ДНК, ΔH по абсолютному значению больше для комплексов митоксантрон-ДНК, а в случае связывания БЭ с полирибонуклеотидами наблюдается совершенно противоположная картина: связывание гораздо сильнее с АУ парами и $\Delta S > 0$, а в случае БЭ с poly(G)-poly(C)- $\Delta S < 0$. Сравнение этих данных показывает, что взаимодействие митоксантрона с двуспиральными НК существенно отличается от интеркаляции БЭ в дц-структуры.

Следует отметить, что полученные нами значения энергетических параметров связывания БЭ и митоксантрона с двуспиральными НК хорошо согласуются с термодинамическими параметрами, полученными другими авторами прямым микрокалориметрическим методом (Bhattacharya, et al., 2014).

Таблица 2.

Значение ΔG , ΔH и ΔS для комплексов НК – митоксантрон и НК-БЭ при ионной силе $\mu=0,11 M Na^+$.

Тип комплекса	$-\Delta G$, Ккал/моль	$-\Delta H$, Ккал/моль	ΔS , кал/моль·К
poly(G) poly(C) - митоксантрон	7,1±0,1	6,4±0,5	2,3±0,2
poly(A) poly(U) - митоксантрон	6,3±0,1	5,7±0,4	2,0±0,3
[poly(G)] ₄ - митоксантрон	7,9±0,1	5,0±0,4	9,4±0,5
ДНК тимуса теленка - митоксантрон	8,0±0,1	5,5±0,4	8,1±0,3
ДНК M.lysodeik.- митоксантрон	8,1±0,1	5,5±0,5	8,4±0,3
poly(G) poly(C) - БЭ	4,1±0,2	7,3±0,4	10,5±0,3
poly(A) poly(U) - БЭ	8,8±0,2	7,6±0,5	3,8±0,3
ДНК тимуса теленка - БЭ	8,0±0,1	9,7±0,4	5,2±0,3

Исследование совместного связывания БЭ и митоксантрона с двухцепочечной ДНК и poly(A)-poly(U). Известно, что НК, особенно РНК, в цитоплазме окружены различными соединениями, которые с ней могут связываться как одинаковыми, так и различными механизмами (Karapetian, et al., 1996, Vardevanyan, et al., 2015). Для выяснения особенностей совместного связывания БЭ и митоксантрона с двухцепочечной ДНК и двухцепочечной РНК проведено сравнительное исследование по взаимодействию одного из этих лигандов в отсутствие другого, с аналогичными данными, полученными для комплексов тройной системы БЭ-НК-митоксантрон. Получены кривые плавления комплексов (кривые не приводятся), которые сдвинуты в высокотемпературную область по сравнению с кривой плавления НК в отсутствие лигандов. Сдвиг обнаруживается как в случае связывания одного, так и в случае двух лигандов. Из кривых плавления определены значения температуры (T_m) и ширины

интервала плавления (ΔT) НК и ее комплексов с лигандами и получены значения изменений $\delta(\Delta T/T_m^2)$. Изменение этих параметров в зависимости от r (r =лиганд/ДНК) позволяет выявить особенности связывания лигандов с НК.

На рис. 6 приведены кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r , полученные для комплексов БЭ и митоксантрона с дц-ДНК. Из приведенного рисунка видно, что в случае комплексов БЭ-ДНК эта зависимость приобретает колоколообразную форму (кривая 1). В случае комплексов митоксантрон-ДНК при низких концентрациях лиганда ($0 < r \leq 0.05$), имеет место увеличение значение $\delta(\Delta T/T_m^2)$ при увеличении r . Дальнейшее увеличение концентрации лиганда приводит к выходу на плато кривой этой зависимости (кривая 2). Зависимость $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r комплекса БЭ-ДНК-митоксантрон (кривая 3), качественно различается от остальных: на этой кривой можно

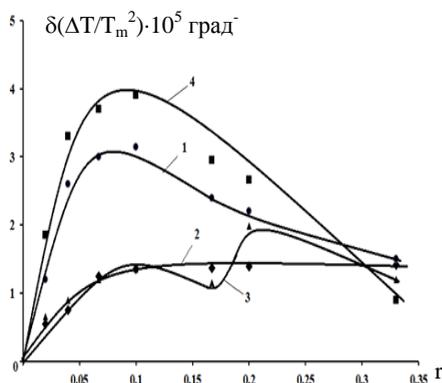


Рис. 6. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r комплексов БЭ-ДНК (1); митоксантрон-ДНК (2), БЭ-ДНК-митоксантрон (3) и ДНК-БЭ+ДНК-митоксантрон (4). Кривая 4 является математической суммой значений $\delta(\Delta T/T_m^2)$ комплексов ДНК-БЭ и ДНК-митоксантрон, при соответствующих значениях r .

выделить два участка: первый — в интервале $0 < r \leq 0,17$, второй — $0,17 < r \leq 0,33$. В интервале $0 < r \leq 0,1$ зависимость $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r в случае БЭ-ДНК-митоксантрон комплексов увеличивается, в области $r \approx 0,1$ проходит через слабо выраженный максимум, далее уменьшается, и в интервале $0,17 < r \leq 0,33$ приобретает колоколообразную форму. Аналогичный эффект был обнаружен при совместном взаимодействии БЭ и полуинтеркалятора МС с ДНК. Схожесть полученных данных позволяет заключить, что основной механизм связывания митоксантрон с дц-ДНК, как и в случае МС, является полуинтеркаляция (Vardevanyan, et al., 2013). Наиболее вероятным объяснением такого поведения кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r , полученной для тройной системы БЭ-ДНК-митоксантрон может быть то, что при низких концентрациях стабилизирующее действие обоих лигандов дц-структуры ДНК не является суммой их отдельных влияний. По всей вероятности, в этих условиях структура тройной системы становится более релаксированной, что способствует денатурации. Дальнейшее увеличение концентрации лигандов приводит к резкому

возрастанию $\delta(\Delta T/T_m^2)$, что наблюдается в случае отдельного влияния БЭ при относительно больших концентрациях ($r > 0.05$) (Рис. 6, кривая 1), в то время как в случае митоксантрона кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r выходит на плато при больших концентрациях лиганда. Этот факт позволяет нам заключить, что при увеличении концентраций обоих лигандов конкуренция между ними становится ощутимой, и превалирующим становится влияние БЭ. Этот результат также подтверждает, что основным способом связывания митоксантрона с дц-ДНК, как и в случае МС (Vardevanyan, et al., 2016, Nafisi, et al., 2007), является полуинтеркаляция.

Существенно другой результат получен при совместном взаимодействии БЭ и митоксантрона с $\text{poly(A)}\cdot\text{poly(U)}$ (кривые не приводятся): кривая зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r по форме практически совпадает с аналогичной кривой, полученной для комплексов БЭ- $\text{poly(A)}\cdot\text{poly(U)}$. Следует отметить, что совместное связывание указанных лигандов с ДНК или РНК не является математической суммой их отдельных взаимодействий, подтверждением которого является построение суммарной кривой зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r (рисунок 6, кривая 4), вид которой практически не отличается от зависимости в случае комплексов БЭ-ДНК (рисунок 6, кривая 1),

Таким образом, нами выявлено, что митоксантрон при относительно больших ионных силах полуинтеркалирует в дц-структуру НК. Аналогичные результаты получаются и при взаимодействии БЭ и митоксантрона с $\text{poly(A)}\cdot\text{poly(U)}$. Сравнение данных БЭ- $\text{poly(A)}\cdot\text{poly(U)}$ -митоксантрон с аналогичными результатами, полученными для тройной системы БЭ-ДНК-митоксантрон, указывает на то, что митоксантрон с РНК связывается намного слабее, чем с ДНК, в то время как БЭ к ДНК или РНК проявляет практически одинаковое средство. Этот факт подтверждается тем, что при совместном связывании БЭ и митоксантрона с $\text{poly(A)}\cdot\text{poly(U)}$, в основном проявляется влияние БЭ на параметры плавления этого полинуклеотида. Кроме этого, полученные данные показывают, что совместное связывание БЭ и митоксантрона с НК не является математической суммой их отдельного связывания, а проявления способов связывания БЭ с указанными НК не зависит от отсутствия или присутствия митоксантрона.

Заключение

В диссертационной работе изучено связывание интеркаляторов митоксантрона и бромистого этидия с двуспиральными НК и четырехцепочечной структурой poly(G)₄ показано, что изменение термодинамических параметров при интеркаляционном способе связывания зависит от структуры боковых групп лигандов. Термодинамические параметры связывания гораздо сильнее изменяются при связывании митоксантрона с двух- и четырехцепочечной НК, который в отличие от БЭ, содержит длинные алифатические боковые группы.

Термодинамические параметры комплексообразования обычно определяют при помощи изотермической микрокалориметрии, которая имеет определенные сложности, связанные с применением относительно больших концентрации НК. В этой связи в работе для определения термодинамических параметров связывания с большой точностью (ошибка меньше 5%) предложен другой, экспериментально более легко доступный спектрофотометрический метод.

Были определены изменения ΔG , ΔH и ΔS при комплексообразовании митоксантрона и БЭ с А и В формами НК. В зависимости от структуры боковых групп плоского хромофора наблюдаются следующие закономерности: БЭ слабее связывается с poly(G)-poly(C), чем poly(A)-poly(U), а митоксантрон связывается с poly(A)-poly(U) слабее, чем poly(G)-poly(C). Значение ΔH при взаимодействии митоксантрона с двуспиральными НК указывает, что этот лиганд связывается полуинтеркаляционным способом. В отличие от БЭ, при связывании митоксантрона с Z-конформацией, Z→V переход не наблюдается. На основании разложения ДКП на гауссовы составляющие, предложен способ исследования избирательности связывания лигандов с нуклеотидными парами.

Выводы

1. Термодинамические параметры взаимодействия митоксантрона с двуспиральными НК отличаются от параметров связывания бромистого этидия с этими полимерами. Низкое значение энтальпии связывания ($\Delta H \approx -5.5$ ккал/моль) митоксантрона по сравнению с значением $\Delta H \approx -(7 \div 10)$ ккал/моль для классических интеркаляторов указывает на полуинтеркаляционную модель связывания митоксантрона с НК.
2. При связывании митоксантрона с двуспиральными ДНК (с В - формой) энтропия связывания ($\Delta S \cong 8,3$ кал/моль·К) почти в 4 раза больше, чем энтропия связывания митоксантрона с двуспиральными полирибонуклеотидами (с А- формой): $\Delta S \cong 2,2$ кал/моль·К, которое является следствием того, что при связывании митоксантрона с двуспиральными НК, помимо интеркаляции колец, определенный вклад в связывание вносит электростатическое взаимодействие.
3. Митоксантрон замедляет В→Z переход, вызванный высокой концентрацией соли $\sim 3.1M$ NaCl, что связано с особенностями механизмов связывания этого лиганда с левозакрученной ДНК.
4. В тройных системах БЭ-ДНК-митоксантрон и БЭ-poly(A)·poly(U)-митоксантрон, на параметры плавления НК превалирующим является влияние БЭ. При взаимодействиях с НК мультимодальные свойства БЭ проявляются независимо от присутствия или отсутствия митоксантрона.
5. Митоксантрон с дц-РНК связывается намного слабее, чем с дц-ДНК, в то время как БЭ к ДНК или РНК проявляет практически одинаковое сродство.
6. При относительно больших ионных силах раствора и при низких концентрациях митоксантрон связывается с НК полуинтеркаляционным, а при больших концентрациях лиганда-слабым электростатическим способом, в то время, как БЭ с НК связывается интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим способами. Совместное взаимодействие этих лигандов с НК не аналогично мультимодальному связыванию одного из них.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ
ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. А.Т.Карапетыян, М.А.Торосян, А.П.Антонян, М.А.Микаелян // Сравнительное изучение механизмов связывания двух различных лигандов с линейным полимером. Научные Труды НУАСА, IV(55), 145-150, 2014.
2. A.T. Karapetyan, M.A. Torosyan, Yu.S.Babayan, M.A.Shahinyan // Mitoxantrone interaction with poly(G). Proc. Yerevan State University, Phys. Math. Sci., 3, 49-54, 2015.
3. A.T. Karapetyan, M.A. Torosyan, Yu.S. Babayan // B-Z transition in poly (dG-dC) in the presence of mitoxantrone. J.Biomolecular Structure and Dynamics, 33, 94, 2015.
4. A.T.Karapetyan, M.Torosyan, Yu.S.Babayan // Antitumor Drug Mitoxantrone Do Not Preclude Salt-driven B-Z Transition of Poly (dG-dC). Intern. J. Biochemistry and Biophysics, 3(4), 49-53, 2015.
5. М.А.Торосян // Исследование избирательности связывания лигандов с АТ-ГС-пар оснований при помощи дифференциальной кривой плавления ДНК. Биологический Журнал Армении. 68, 4, 81-84, 2016.
6. М.А. Torosyan // Simple Method for Determining of the Thermodynamic Parameters of Ligand with Nucleic Acids Interaction. Armenian journal of Physics, 10, 1, 42-48, 2017.
7. М.А.Торосян // Выявление избирательности связывания митоксантрона с АТ- и ГС- парами методом спектрального поглощения. Биологический Журнал Армении. 69, 2, 76-81, 2017.
8. А.Р. Antonyan, М.А. Torosyan, М.А. Parsadanyan // Study of competitive interaction of ethidium bromide and mitoxantrone with nucleic acids. Proc. Yerevan State University, Chem. Biol., 52, 1, 52-57, 2018.
9. А.Р. Antonyan, М.А. Torosyan, А.Т. Karapetyan // Interaction of different intercalators with DNA in three-component systems. Biolog. J. of Armenia, 70, 1, 6-11, 2018.

ԹՈՐՈՍՅԱՆ ՄԱՐԳԱՐԻՏԱ ԱՆԴՐԵՅԻ

ՀԱՐԹ ՔՐՈՍՈՖՈՐՈՎ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՆՈՒՎԼԵԻՆԱԹՈՒՆԵՐԻ ՀԵՏ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. միտոքսանտրոն, երկ- և քառաշղթա նուկլեինաթթուներ, ինտերկալյացիա, կիսաինտերկալյացիա, $B \rightarrow Z$ անցում:

Ներկայացված ատենախոսության մեջ փորձարարականորեն ուսումնասիրվել են երկ- և քառաշղթա նուկլեինաթթուների (ՆԹ) հետ հարթ քրոմոֆոր պարունակող լիզանդների (միտոքսանտրոնի և էթիդիումի բրոմիդի (ԷԲ)) փոխազդեցության առանձնահատկությունները, կախված կողմնային խմբերի կառուցվածքից: Բացահայտվել է, որ ի տարբերություն ԷԲ-ի (պարունակում է ցիկլային կողմնային խումբ) միտոքսանտրոնը (պարունակում է դրական լիցքավորված ալիֆատիկ խմբեր) երկշղթա poly(A)·poly(U) և poly(G)·poly(C) պոլիռիբոնուկլեոտիդների հետ փոխազդում է կիսաինտերկալյացիայի մեխանիզմով: ՆԹ-ի հետ լիզանդների փոխազդեցության ջերմադինամիկական պարամետրերը սովորաբար որոշվում են իզոթերմիկ միկրոկալորիմետրիայի մեթոդով, որը ծախսատար է և կապված է մի շարք դժվարությունների հետ: Ատենախոսության մեջ կապման ջերմադինամիկական պարամետրերը որոշվել են կապման իզոթերմից քիչ ծախսատար և հեշտ հասանելի սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով:

Փորձերի արդյունքները ցույց են տվել նաև, որ միտոքսանտրոնի խնամակցությունը [poly(G)]₄ քառաշղթա կառուցվածքի նկատմամբ ավելի ուժեղ է ($K=4.3 \cdot 10^5$ մոլ⁻¹), քան poly(G)·poly(C) պեռիռիբոնուկլեոտիդի ($K=9.8 \cdot 10^4$ մոլ⁻¹), սակայն ավելի թույլ է, քան ԴՆԹ-ի ($K=5 \cdot 10^4$ մոլ⁻¹) նկատմամբ: Կապման հետևանքով համակարգի էնթալպիայի փոփոխության մեծությունը ($\Delta H \approx -(5-6)$ կկալ/մոլ) բացարձակ արժեքով փոքր է երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման էնթալպիայի մեծությունից: ԴՆԹ-ի հետ միտքսանտրոնի և ԷԲ-ի փոխազդեցության ջերմադինամիկական պարամետրերի համեմատումը ցույց է տալիս, որ ԷԲ-ը կապվում է ինտերկալյացիայի եղանակով, իսկ միտոքսանտրոնը կիսաինտերկալյացիայի: Այս երևույթը հավանաբար պայմանավորված է երկշղթա

պարույրի կապման տեղի երկրաչափության, համակարգի հիդրատացիայի, լիցքերի լուկալ խտության և կապման տեղերի մակաձված փոփոխությունների հետ:

Հալման դիֆերենցիալ կորերի և ՆԹ-ի կլանման տիրույթի տարբեր ալիքի երկարությունների տակ կատարված ուսումնասիրությունների միջոցով որոշվել է միտոքսանտրոնի խնամակցությունը GC-գույգ հիմքերի նկատմամբ:

Ուսումնասիրվել է միտոքսանտրոնի ազդեցությունը աղի բարձր կոնցենտրացիայով ($\approx 3,1$ մոլ NaCl) հրահրված B \rightarrow Z անցման պրոցեսի վրա: Բացահայտված է, որ միտոքսանտրոնը դանդաղեցնում է, դայց չի կասեցնում B \rightarrow Z անցումը:

Միտոքսանտրոնի և ԷԲ-ի երկշղթա ԴՆԹ-ի և poly(A) \cdot poly(U) պոլիռիբոնուկլեոտիդների եռաբաղադրիչ կոմպլեքսների հալման պարամետրերի փոփոխությունները մատնանշում են ԷԲ-ի գերակայող ազդեցությունը հալման ջերմադինամիկական բնութագրերի վրա:

TOROSYAN MARGARITA A.

INTERACTION OF LIGANDS WITH FLAT CHROMOPHORE WITH NUCLEIC ACIDS

SUMMARY

Keywords: *mitoxantrone, double- and four-stranded nucleic acids, intercalation, semi-intercalation, B→Z transition.*

In the presented dissertation the interaction peculiarities of ligands containing flat chromophore (mitoxantrone, and ethidium bromide (EtBr)) with double- and four-stranded nucleic acids (NA) depending on structure of side groups have been studied. It was revealed that in spite of EtBr (it contains cyclic side group), the mitoxantrone (it contains positively charged aliphatic groups) interacts with double-stranded poly(A)-poly(U) and poly(G)-poly(C) polyribonucleotides by the semi-intercalation mechanism. Thermodynamic parameters of the interaction of ligands with NA are usually determined by isothermic microcalorimetry method which requires more expenses and is connected with number of difficulties. By this reason in this work the binding thermodynamic parameters were determined by spectrophotometric mode from the obtained binding isotherms.

The results of experiments also showed that the mitoxantrone affinity to [poly(G)]₄ four-stranded structure is higher ($K=4.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), than to poly(G)-poly(C) polyribonucleotide ($K=9.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), but is weaker, than to DNA ($K=5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$). Due to the binding, the system enthalpy change value ($\Delta H \approx (5 \div 6) \text{ kcal/M}$) is lower by its absolute value as compared to that of EtBr binding to double-stranded DNA by intercalation mode, which indicates the mitoxantrone binding by semi-intercalation mode. Comparison of the thermodynamic parameters of mitoxantrone and EtBr interaction with DNA showed that EtBr binds by intercalation mode and mitoxantrone – semi-intercalation mode. This phenomenon is probably conditioned by binding site geometry of double-stranded helix, system hydration, induced changes of local density of charges and form of binding sites.

The mitoxantrone affinity to GC- bases pairs was determined by analysis of differential curves and of heterogeneous caef thimus DNA and studies of melting curves at different wavelengths in NA absorption interval.

In order to elucidate the effect of side groups on flat chromophore intercalation interaction with DNA B-form, the mitoxantrone binding to left helical Z-conformation as

well as Z→B transition process have been studied.

Joint complex-formation of the mitoxantrone and EtBr with double-stranded DNA and poly(A)-poly(U) polyribonucleotides was studied and it was found out that due to the joint binding of two ligands, EtBr influence on the melting characteristics of double-stranded DNA and poly(A)-poly(U) polyribonucleotides prevails.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'I. Koval' or similar, with a horizontal line and an arrow pointing to the right above the name.