

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄԻՆԱՍՅԱՆՑ ՄԻՔԱՅԵԼ ՎԱՀԱՆԻ

ՄԻՆԹԵՏԻՎ ՊՈԼԻՒՆՈՒԿԼԵՏԻԴՆԵՐԻ ՀԵՏ ԷԹԻԴԻԱՆԻՄ ԲՐՈՍԻԴԻ ՎԱՊՄԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

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

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2016

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНАСЯНЦ МИКАЕЛ ВААНОВИЧ

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С СИНТЕТИЧЕСКИМИ
ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Կենն. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Պ.Հ. Վարդևանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կենն. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Հ.Ռ. Վարդապետյան
ֆիզմաթ. գիտ. թեկնածու
Ի.Վ. Վարդանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսա-
բանության ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. մայիսի 6-ին ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՒՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 Մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2016թ. ապրիլի 5-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, կենն. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор биол. наук, профессор
П.О. Вардеванян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, профессор
Г.Р. Вардапетян
кандидат физ.-мат. наук
И.В. Варданян

Ведущая организация:

Институт Молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 6-го мая 2016г. в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукиана 1, ЕГУ, факультет биологии).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 5-го апреля 2016г.

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

М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы: Регуляция работы генов осуществляется посредством взаимодействия лигандов различной природы с ДНК. Лиганды служат тем инструментом живой клетки, который позволяет сохранять, проявлять и своевременно востребовать генетическую информацию. Лиганды играют ключевую роль при трансляции генетической информации, в результате которой и возникает сложная упорядоченность структур и процессов в живой клетке (Нечипуренко, 2015).

Влияние различных факторов на структуру и структурные переходы ДНК исследовано достаточно хорошо, в то время как однотипные последовательности *в природных ДНК* могут иметь важное и определяющее значение на ее функционирование при связывании с лигандами. С этой точки зрения, исследование взаимодействия лигандов с синтетическими полинуклеотидами является актуальным. Более того, эти вопросы представляют особую важность, так как помимо одноцепочечной и двухцепочечной структур, ДНК может приобрести третичную или четвертичную структуру в виде различных образований, в том числе – трех- и четырехцепочечных структур. Эти неканонические структуры могут образовываться только в определенных последовательностях.

Вопросы понимания функционирования ДНК могут быть успешно рассмотрены также с позиции влияния различных низкомолекулярных веществ на ее структуру и функции (Lane & Jenkins 2000). Этот вопрос актуален, поскольку ДНК в клетке находится в окружении различных неорганических и органических молекул, которые непосредственно или опосредовано влияют на ее пространственную структуру, тем самым, стимулируют или подавляют ее функциональную активность (Lin et al. 2015, Deng et al. 2014). Более того, некоторые лиганды являются подходящими сенсорами для обнаружения ДНК в различных образцах, в которых она присутствует в наномолярных концентрациях. При этом, можно разделить различные участки ДНК вплоть до фрагментов, содержащих всего 100 пар оснований (Jung et al. 2015).

Цель и задачи работы: Целью настоящей диссертационной работы явилось исследование молекулярных механизмов взаимодействия классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ) с различными синтетическими полинуклеотидами структурами.

Для осуществления поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

- изучение спектральных характеристик комплексов ДНК с лигандами интеркаляторами;
- изучение поведения изобестической точки в спектрах поглощения комплексов ДНК с БЭ;
- анализ спектров поглощения и разностного поглощения комплексов БЭ с ДНК;
- исследование взаимодействия БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] и poly(dA)-poly(dT) и определение параметров связывания;
- исследование связывания БЭ с poly(dA) при различных значениях pH раствора и оценка структурных особенностей этого полинуклеотида;

- определение значения констант связывания K и числа оснований n , приходящих на одно место связывания БЭ с poly(dA) при различных pH раствора;
- исследование взаимодействия БЭ с poly(G)₄ при различных ионных силах раствора и определение термодинамических параметров связывания.

Научная новизна: Результаты диссертационной работы открывают новые возможности в изучении взаимодействия различных лигандов с НК (нуклеиновыми кислотами). В частности, в работе впервые получены данные о роли изобестической точки в спектрах комплексов ДНК с лигандами интеркаляторами. Одним из важных результатов является то, что наличие такой точки позволяет однозначно удостовериться об интеркаляционном механизме взаимодействия.

Важными являются также данные по взаимодействию БЭ с гомополинуклеотидами, содержащими однотипные нуклеотиды, однако имеющие различную последовательность. Гомополинуклеотиды могут принимать различные нестандартные структуры в зависимости от условий среды, что может отражаться на характере взаимодействия БЭ с ними. В частности, результаты исследований выявили, что БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] связывается некооперативно, как и с природной ДНК, в то время как с poly(dA)-poly(dT) взаимодействие кооперативное. Это обусловлено структурными различиями в структурной организации этих полинуклеотидов. Также показано, что poly(dA) может находиться в различных структурных состояниях в зависимости от степени протонирования. В определенном интервале pH раствора ($7.0 > \text{pH} \geq 4.0$), этот полинуклеотид находится в одноцепочечном, в то время как в интервале $4.0 > \text{pH} \geq 3.0$ – в двухцепочечном состоянии. При $3.0 > \text{pH}$ poly(dA) вновь переходит в одноцепочечное состояние. Также результаты исследований выявили, что с poly(G), который в условиях $I \geq 0.1$ М (I – ионная сила раствора) находится в четырехцепочечном состоянии, БЭ связывается полуинтеркаляционным способом, как и в случае одно- и двухцепочечными формами ДНК.

Практическое значение: Полученные результаты могут быть ценными и имеют прикладное значение, поскольку выявляют некоторые особенности связывания БЭ с различными синтетическими гомополинуклеотидами в зависимости от типа их нуклеотидного содержания, а также от условий среды. Эти результаты важны и с той точки зрения, что могут быть полезными для изучения взаимодействия других лигандов с НК и разработки новых лекарственных препаратов на их основе.

Экспериментальные результаты данной работы открывают новые возможности для дальнейших исследований в этой области. Полученные данные могут быть также использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ и в научных лабораториях, занимающихся исследованиями по изучению взаимодействия лигандов с ДНК.

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры биофизики ЕГУ и на следующих научных конференциях: International Conference “Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior”, Yerevan, 2013; The 18th and 19th Conversation, Albany (USA) 2013.

Публикации: По теме диссертации опубликованы 8 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, насчитывающего 151 наименование. Диссертация изложена на 116 страницах, включает 23 рисунка и 1 таблицу.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении кратко описывается структура диссертационной работы, обсуждаются ее цель, актуальность и научное значение.

В первой главе приведен литературный обзор по взаимодействию лигандов с ДНК. Детально описаны данные по равновесному связыванию малых молекул с ДНК, а также механизмы этих взаимодействий. Отдельно представлены данные по связыванию интеркаляторов, в частности, бромистого этидия с ДНК. Отдельным параграфом приведены данные по неканоническим формам ДНК и их биологической роли.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования.

В работе были использованы сверхчистая ДНК тимуса теленка (“Sigma”, США), синтетические полинуклеотиды poly(dA)-poly(dT), poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] (с одинаковой длиной цепи), poly(dA), poly(G) (“Sigma” (США)), БЭ, “Serva” (Германия), метиленовый синий (МС) (“Sigma” (США)), NaCl, Na-цитрат, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), HCl (ос.ч.). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации использованных препаратов были определены абсорбционным методом, используя следующие коэффициенты экстинкции: ДНК тимуса теленка - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, poly(dA)-poly(dT) - $\epsilon_{260}=6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, poly(dA) $\epsilon_{260}=10,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, poly(G) $\epsilon_{260}=9900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, БЭ - $\epsilon_{480}=5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, МС - $\epsilon_{664}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Исследования проводились в соответствующих ионных силах раствора, температурах и pH. Экспериментальные измерения проведены при ионных силах раствора 0.02; 0.11; 0.31 и 0.51 М. Для установления данной ионной силы маточный раствор 1xSSC (стандартный солевой-цитратный раствор, содержащий 0.15 М NaCl, 0,015 М Na-цитрат (трехзамещенный), 10^{-5} М ЭДТА) разбавлялся бидистиллированной водой.

Спектрофотометрические измерения проводились на однолучевом спектрофотометре Jenway 6715 UV-VIS (Англия) и двулучевом спектрофотометре PIE Unicam SP8-100 (Англия). Измерение поглощения осуществлялось в герметически закрытых кварцевых кюветах, длиной оптического пути 1см, с одинаковыми оптическими параметрами. Средняя чувствительность PIE Unicam SP8-100 в рабочем диапазоне спектра соответствует изменению $\Delta I/I=10^{-4}$, что в конечном итоге дает общую погрешность, не превышающую 3%. При регистрации разностного поглощения в качестве базовой линии был взят спектр поглощения раствора лиганда в отсутствие ДНК. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия). Для спектрофотометрических измерений использовали кварцевые кюветы объемом 3 мл, длиной оптического пути 1 см.

Измерение pH растворов проводилось с помощью универсального иономера ЭВ-74 (СССР) с электродом измерительным ЭСЛ 63-07. Раствор НК и ее комплексов с БЭ титровали 0.2 н HCl до достижения соответствующих значений pH, перемешивали на магнитной мешалке, после чего регистрировали значение pH. Погрешность измерений pH не превышала ± 0.02 . pH измерения осуществлялись при температуре 25°C, при нейтральном (pH \approx 7,0) и при кислых значениях pH (pH \approx 5,5; pH \approx 3,5; pH \approx 2,5). Указанные значения pH выбраны, исходя из того, что при pH \approx 7,0, а также в

интервалах изменения $6,0 > pH \geq 5,5$; и $3,0 > pH \geq 2,5$ poly(dA) находился в оц-, в интервале же $4,0 > pH > 3,0$ – в дц-состояниях. Титрование рабочих растворов лигандов раствором НК осуществлялось микропипеткой с общим объемом 10мкл (“Hamilton”, США).

В третьей главе приведены результаты собственных исследований и их обсуждение.

Спектральные характеристики комплексов интеркаляторов БЭ и МС с ДНК.

Исследования по взаимодействию интеркаляторов с ДНК спектрофотометрическим методом основаны на том, что спектры поглощения комплексов претерпевают значительные изменения. Проведенные экспериментальные исследования комплексов БЭ с ДНК методом абсорбционной спектроскопии в интервале изменения длины волны $400 \leq \lambda \leq 600$ нм выявили, что при связывании этого лиганда имеет место уменьшение максимумов спектров поглощения при $\lambda_{max}=480$ нм и сдвиг в сторону более длинных волн, по мере увеличения концентрации ДНК в растворе, при постоянной концентрации БЭ (Vardevanyan et.al. 2003). Это является следствием того, что свободные и связанные с ДНК молекулы этого лиганда имеют различные максимумы поглощения. При этом, в спектрах поглощения комплексов БЭ-ДНК проявляется изобестическая точка при $\lambda=510$ нм, поскольку как связанные, так и свободные молекулы этого лиганда в этой точке имеют одинаковое поглощение.

Эти особенности спектров поглощения БЭ при связывании с ДНК обусловлены тем, что этот лиганд с ней связывается несколькими способами и, при относительно низких концентрациях ДНК, молекулы лиганда насыщают все места связывания, соответствующие всем способам связывания. Вследствие этого наблюдается уменьшение интенсивности поглощения БЭ при $\lambda=480$ нм и сдвиг в длинноволновую область. При концентрациях $C_{ДНК} \gg C_{БЭ}$ в спектрах поглощения комплексов начинают проявляться пики при $\lambda=525$ нм. При этих условиях основным способом связывания БЭ с ДНК становится только интеркаляция (при больших значениях соотношениях концентраций ДНК/БЭ). При этом, спектры поглощения комплексов начинают отклоняться от изобестической точки. Это обусловлено тем, что при увеличении концентрации ДНК имеет место перераспределение связанных всеми способами молекул лиганда на свободные интеркаляционные места (поскольку интеркаляция является основным способом связывания БЭ и характеризуется большей константой связывания (Vardevanyan et.al. 2003).

Для точного анализа изобестической точки (ИТ) в спектрах поглощения комплексов БЭ-ДНК применен следующий подход. Пусть имеется N спектров титрования $A_i(\lambda)$ с номерами $1 \leq i \leq N$. Спектр с номером $i=1$ соответствует исходному раствору несвязанного БЭ, причем, большие значения i соответствуют более высоким концентрациям ДНК. Выделим группу спектров с номерами $1 \leq i \leq k$, где k может находиться в интервале $1 \leq k \leq N$, и рассчитаем для нее усредненный спектр:

$$\bar{A}_k(\lambda) = k^{-1} \cdot \sum_{i=1}^k A_i(\lambda) \quad (1)$$

Далее найдем среднее квадратичное отклонение спектров данной группы от ее среднего спектра $\sigma_k(\lambda)$:

$$\sigma_k(\lambda) = \{k^{-1} \cdot \sum_{i=1}^k [A_i(\lambda) - \bar{A}_k(\lambda)]^2\}^{1/2}; \quad \sigma_1(\lambda) \equiv 0 \quad (2)$$

а также среднее квадратичное отклонение для всех N спектров $\sigma(\lambda)$:

$$\sigma(\lambda) = \{N^{-1} \cdot \sum_{i=1}^N [A_i(\lambda) - \bar{A}_N(\lambda)]^2\}^{1/2} \quad (3)$$

Положение минимума функции $\sigma(\lambda)$ соответствует приближенному положению изобестической точки λ_{IP} . Для найденного значения λ_{IP} рассчитываются N значений $\sigma_k(\lambda_{IP})$ для $k = 1, \bar{N}$.

$$\bar{A}_{k_1, k_2}(\lambda) = (k_2 - k_1 + 1)^{-1} \cdot \sum_{i=k_1}^{k_2} A_i(\lambda) \quad (4)$$

$$\sigma_{k_1, k_2}(\lambda) = \{(k_2 - k_1 + 1)^{-1} \cdot \sum_{i=k_1}^{k_2} [A_i(\lambda) - \bar{A}_{k_1, k_2}(\lambda)]^2\}^{1/2} \quad (5)$$

Данная зависимость используется для определения интервала номеров спектров ($k_1 \leq i \leq k_2$), характеризующихся малым значением $\sigma_k(\lambda_{IP})$, которые следует использовать для точного определения положения изобестической точки, а также для определения минимальной концентрации ДНК, при которой происходит отклонение спектров от изобестической точки. По формуле (5) была рассчитана зависимость σ от λ на основании спектров поглощения комплексов БЭ-ДНК и построен график, приведенный на рис. 1. Минимум, наблюдаемый на этом графике при длине волны 510нм, соответствует приближенному положению изобестической точки ($\lambda_{IP}=510$ нм). Расчеты, проведенные по формулам (4), (5), подтвердили первоначально найденное положение изобестической точки ($\lambda_{IP}=510$ нм).

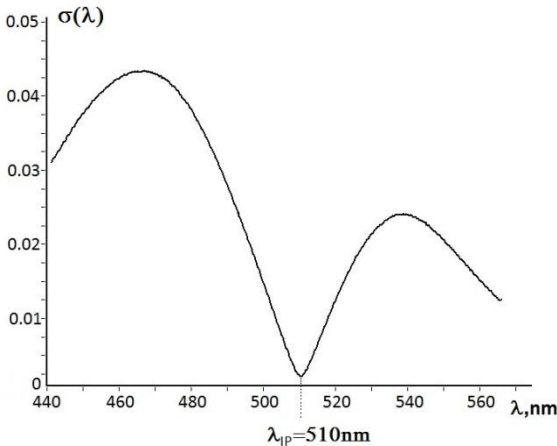


Рис. 1. Зависимость значений среднеквадратичного отклонения поглощения от длины волны $\sigma(\lambda)$, рассчитанного по формуле (24) для всех спектров ($k=N=40$).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в спектрах комплексов БЭ-ДНК экспериментально регистрируется отчетливая ИТ. Анализ спектров предложенной моделью подтверждает наличие отчетливой ИТ, при этом, длина волны ИТ, зарегистрированная экспериментально, с точностью совпадает с $\lambda_{IP}=510$ нм, определенной математическим анализом. Полученные данные также выявляют, что при достаточно больших концентрациях ДНК, спектры комплексов отклоняются от ИТ и на графике зависимости σ от числа спектров k образуются два участка, что указывает на то, что для БЭ существует, по крайней мере, два типа адсорбционных центров на ДНК.

Аналогичные исследования проведены и для случая связывании МС с ДНК в интервале изменения длины волны $500 \leq \lambda \leq 750$ нм, при $I=0.02$ М. В спектрах поглощения МС в видимой области света имеет место максимум поглощения при 664 нм, с плечом при ~ 620 нм. В присутствии увеличивающегося количества ДНК поглощение МС уменьшается (гипохромный эффект). При этом, при низких концентрациях ДНК ($C_{ДНК} \ll C_{МС}$) в основном проявляется гипохромный эффект, в то время как сдвиг λ_{max} практически не обнаруживается. При увеличении концентрации ДНК наряду с гипохромным эффектом проявляется также небольшой длинноволновый сдвиг ($\sim 5-6$ нм), что обычно наблюдается в спектрах поглощения при интеркаляции лигандов в ДНК. При этом, в спектрах ДНК-МС обнаруживается “кажущаяся” изобестическая точка. Проведенный вышепредложенным методом анализ не выявил истинную ИТ в спектрах комплексов МС-ДНК, из чего можно полагать, что в спектрах этих комплексов образуется псевдо (кажущаяся) изобестическая точка. Тем не менее, длинноволновый сдвиг максимумов спектров комплексов ДНК-МС примерно на 5-6 нм может быть следствием того, что этот лиганд, при больших концентрациях ДНК также связывается в основном интеркаляционным механизмом. На основании этого мы полагаем, что в случае МС небольшой красноволновый сдвиг пиков обусловлен тем, что при ионной силе раствора 0,02М проявляется полуинтеркаляционный способ (Vardevanyan et. al., 2013).

Таким образом, на основании проведенных исследований мы заключаем, что спектральные характеристики БЭ и МС зависят от механизмов их связывания. При полной интеркаляции молекул лиганда в ДНК, в спектрах комплексов образуется истинная ИТ, при полуинтеркаляционном же способе – псевдоизобестическая точка.

Спектры поглощения и флуоресценции комплексов poly(dA)-poly(dT) и poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] с БЭ. Абсорбционным и флуориметрическим методами исследовано взаимодействие БЭ с двумя синтетическими двухцепочечными (дц) гомополинуклеотидами, состоящими из адениновых и тиминового оснований, причем один из них является гомопурин-гомопиримидиновой спиралью, другой - пурин-пиримидин альтернирующей спиралью. На рис. 2 приведены спектры абсорбции (А) и флуоресценции (Б) БЭ (кривые 1) и его комплексов с poly(dA)-poly(dT) (кривые 2-17 на рис. 2 А и 2-13 – на рис. 2 Б). Аналогичные спектры получены для poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] (спектры не приводятся). Из приведенного рисунка видно, что, как и в случае ДНК, при связывании с указанными полинуклеотидами спектры поглощения БЭ уменьшаются в максимумах и сдвигаются в длинноволновую область, по

сравнению со спектром этого лиганда в отсутствие полинуклеотидов. При этом, в спектрах поглощения комплексов БЭ с этими полинуклеотидами образуется отчетливая изобестическая точка.

Из рис. 2 Б видно, что интенсивность флуоресценции комплексов БЭ-poly(dA)-poly(dT) возрастает примерно в 40-50 раза по сравнению с интенсивностью флуоресценции БЭ. Этот факт обусловлен тем, что молекулы лиганда, интеркалируя в плоскость между парами оснований, становятся недоступными для молекул тушителя (в данном случае для воды и растворенного в ней молекулярного кислорода), вследствие чего и возрастает интенсивность флуоресценции (Lakowicz, 2006). Из спектров поглощения и интенсивностей флуоресценции комплексов БЭ с poly(dA)-poly(dT) и poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] получены значения τ/C_f и τ и построены кривые зависимостей, которые приведены на рис. 3. Как видно из приведенного рисунка, взаимодействие БЭ с poly(dA)-poly(dT) (рис. 3А) кооперативное, в то время как с ди-poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] (рис. 3 Б) кооперативность не обнаруживается. Более того, кривые связывания БЭ с этим полинуклеотидом в координатах Скетчарда совпадают с аналогичными кривыми, полученными при взаимодействии БЭ с ДНК. Известно, что poly(dA)-poly(dT) имеет структуру отличную от таковой ДНК. Помимо этого, этот полинуклеотид более гидратирован и имеет более жесткую структуру, чем ДНК (Зенгер В 1987). По всей видимости, эти структурные особенности poly(dA)-poly(dT) и являются причиной возникновения кооперативности при интеркаляции БЭ в двухцепочечную структуру этого полинуклеотида.

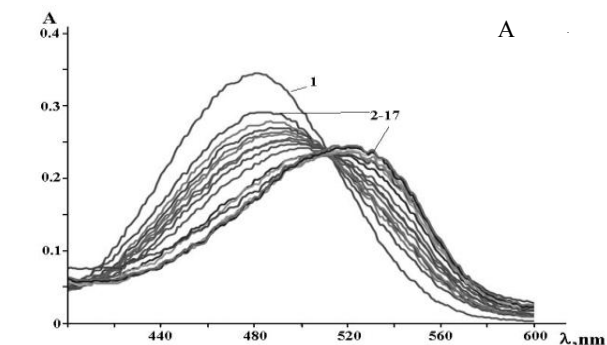
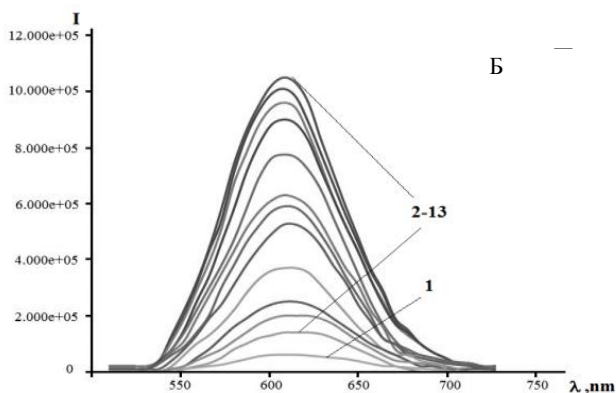


Рис. 2. А – спектры поглощения БЭ и его комплексов с poly(dA)-poly(dT). Б – спектры интенсивностей флуоресценции БЭ и его комплексов с poly(dA)-poly(dT).



Вычитанием кривой 2 из кривой 1, при одних и тех же значениях γ , получена кривая 3. Как видно из приведенного рисунка, кривая 3 слабо возрастает в интервале $0 < \gamma \leq 0.06$, затем, с увеличением γ , эта кривая претерпевает небольшое уменьшение.

Примечательно, что кривые связывания, полученные из абсорбционных и флуориметрических данных (кривые 1 и 2 на рис. 3А) различаются.

В частности, из рис. 3 Б видно, что связывание БЭ с этим полинуклеотидом не носит кооперативный характер. Это указывает на то, что структуры poly(dA)-poly(dT) и poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] радикально отличаются. Как видно из рис. 3 Б, кривая связывания, полученная из абсорбционных данных (кривая 1), нелинейная и состоит из двух участков.

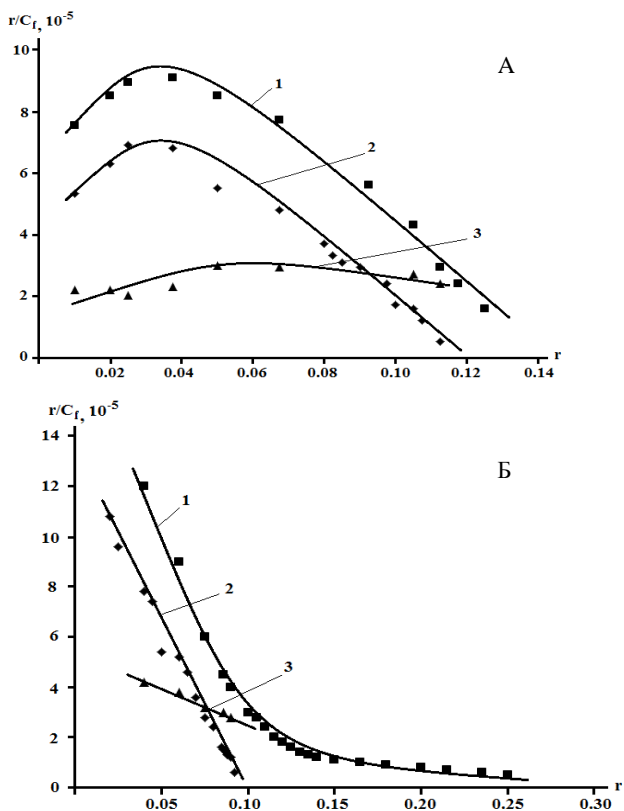


Рис. 3. А – Кривые связывания БЭ с poly(dA)-poly(dT), полученные на основании спектров поглощения (кривая 1) и интенсивностей флуоресценции (кривая 2). Б - Кривые связывания БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], полученные на основании спектров поглощения (кривая 1) и интенсивностей флуоресценции (кривая 2). Кривые 3 на А и Б получены вычитанием кривой 2 из кривой 1. Ионная сила раствора $I=0.02$ М, $pH=7.2$.

В то же время, кривая 2, полученная из флуориметрических данных, линейная. Различаются также кривые 1 и 2, приведенные на рис. 3 Б. В этом случае также вычитанием кривой 2 из кривой 1 получена кривая 3. Как видно, эта кривая при $r \approx 0.15$ пересекается с кривой 1. Схожесть полученных данных с аналогичными результатами комплексов БЭ-ДНК указывают на то, что БЭ с этими полинуклеотидами кроме сильного, флуоресцирующего (интеркаляционного), образует также сильный нефлуоресцирующий (полуинтеркаляционный) комплексы.

Из кривых связывания БЭ с poly(dA)-poly(dT) и $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ определены параметры K и n . Из полученных данных выявляется, что при сильном способе связывания БЭ с poly(dA)-poly(dT) $K_1 \approx 10 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_1 \approx 4,5-5$, при слабом способе – $K_2 \approx 3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_2 \approx 2$, при связывании же с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ – $K_1^{\text{ф}} \approx 1,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n_1 \approx 5$, $K_1^{\text{а6с}} \approx 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n_1 \approx 4-4,5$, $K_2^{\text{нф}} \approx 5,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_2 \approx 3$. Необходимо отметить, что K_s , соответствующая интеркаляционному способу связывания БЭ с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ больше, чем значение K_s , для комплексов БЭ- poly(dA)-poly(dT) примерно в два раза. Мы полагаем, что это различие обусловлено структурной особенностью poly(dA)-poly(dT) по сравнению с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ и ДНК, а также кооперативностью связывания БЭ с poly(dA)-poly(dT) .

Высокая степень гидратированности этого полинуклеотида приводит к тому, что интеркаляция молекул БЭ в плоскость пар оснований полинуклеотида затруднена, поскольку при интеркаляции молекулы лиганда должны вклиниваться в плоскость между парами оснований и вступить в стэкинг взаимодействие с ними. $\text{Poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ же менее гидратирована и ее структура мало отличается от структуры ДНК, что приводит к тому, что БЭ с этим полинуклеотидом связывается некооперативно. Аналогично, второй способ связывания БЭ с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ также примерно в два раза больше, чем с poly(dA)-poly(dT) . С другой стороны, из полученных данных выявляется, что с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ БЭ связывается еще одним, более слабым способом, характеризующимся константой связывания – $K_3 \approx 1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_3 \approx 1,5$. Как и в случае ДНК, этот способ соответствует электростатическому механизму связывания (Vardevanyan et al. 2003).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что взаимодействие БЭ с НК зависит от типа оснований и их последовательности (Веселков и др, 1997). Так, из полученных данных следует, что БЭ с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ связывается тремя способами: интеркаляционным, полуинтеркаляционным и слабым (электростатическим), как и в случае ДНК, в то время как с poly(dA)-poly(dT) – двумя – интеркаляционным и полуинтеркаляционным. При этом, различаются и константы связывания БЭ с этими полинуклеотидами интеркаляционным способом. В случае poly(dA)-poly(dT) значение константы связывания (K) меньше, чем в случае $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$. Этот факт обусловлен тем, что poly(dA)-poly(dT) , по сравнению с $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$, имеет более высокую степень гидратированности и более жесткую структуру, что затрудняет внедрение молекул интеркалятора в плоскость пар оснований.

Другая важная особенность полученных данных в том, что слабый электростатический способ связывания БЭ с poly(dA)-poly(dT) не обнаруживается. Тем не менее, не исключается возможность того, что БЭ может связываться электростатически с этим полинуклеотидом. Выявлено также, что связывание БЭ с poly(dA)-poly(dT) носит кооперативный характер. Это в некоторых случаях может

иметь важное биологическое значение, в частности, способствовать более тонкой модуляции функций ДНК в клетке.

Изучение структуры poly(A) в нейтральных и кислых средах. Полученные нами экспериментальные данные указывают на то, что механизмы связывания БЭ с ДНК универсальны и реализуются практически независимо от различных факторов среды (ионная сила, рН). Основываясь на это, исследовано взаимодействие БЭ с poly(dA) при различных значениях рН раствора. Этот полинуклеотид обладает некоторыми структурными особенностями. При щелочных, нейтральных или сильно кислых рН раствора poly(dA) находится, в основном, в одноцепочечном состоянии, однако в интервале $4,0 > \text{pH} > 3,0$ этот полинуклеотид, протонируясь, переходит в двухцепочечное состояние, поскольку отдельные цепи образуют пары типа poly(dAN⁺)-poly(dAN⁺), как и в случае полирибоадениловой кислоты (Зенгер В, 1987). При более кислых растворах этот полинуклеотид опять переходит в одноцепочечное состояние. Следовательно, исследование связывания БЭ с poly(dA) при различных рН может позволить оценить структурные особенности последнего в растворе. Комплексообразование БЭ с poly(dA) нами исследовано методом спектрофотометрической титрации в условиях $\text{pH} \approx 7,0$, $\text{pH} \approx 5,5$; $\text{pH} \approx 3,5$ и $\text{pH} \approx 2,5$.

Получены спектры поглощения БЭ и его комплексов при $\text{pH} \approx 3,5$ и $\text{pH} \approx 7,0$, которые по форме аналогичны спектрам поглощения комплексов БЭ-ДНК (спектры не приводятся). При $\text{pH} \approx 3,5$ спектры поглощения комплексов БЭ-poly(dA) уменьшаются в максимумах и сдвигаются в длинноволновую область. При этом, в спектрах образуется изобестическая точка $\lambda \approx 510$ нм. Изменения в спектрах поглощения комплексов БЭ с poly(dA) схожи со спектрами поглощения комплексов БЭ с двухцепочечной ДНК при нейтральных рН. Однако, спектры поглощения БЭ с poly(dA) при $\text{pH} \approx 7,0$, аналогичны таковым, полученным для комплексов БЭ с одноцепочечной ДНК. Получены также спектры поглощения комплексов БЭ-poly(dA) при $\text{pH} \approx 5,5$ и $\text{pH} \approx 2,5$. При $\text{pH} \approx 5,5$ спектры поглощения комплексов БЭ-poly(dA) совпадают со спектрами этих комплексов, полученных при $\text{pH} \approx 7,0$ (спектры не приводятся), в то время как изменения в спектров при $\text{pH} \approx 2,5$ незначительные. На основании спектров поглощения БЭ и его комплексов с poly(dA) построены кривые связывания в координатах Скетчарда.

На рис. 4 А приведена кривая связывания БЭ с poly(dA), полученная при $\text{pH} \approx 3,5$, на рис. 4 Б – кривые, полученные при $\text{pH} \approx 7,0$; $\text{pH} \approx 5,5$ и $\text{pH} \approx 2,5$. При этом, экспериментальные точки, полученные при $\text{pH} \approx 7,0$ и $\text{pH} \approx 5,5$ практически совпадают друг с другом. Из приведенного рисунка видно, что наклон кривой связывания, полученной при $\text{pH} \approx 3,5$, намного больше, чем кривых, полученных при остальных рН. При этом, при $\text{pH} \approx 2,5$ кривая связывания имеет практически нулевой наклон. Этот факт, по всей вероятности, обусловлен тем, что при $\text{pH} < 3,0$ все ионизирующие группы как poly(dA), так и БЭ находятся в полностью протонированном состоянии. Полиадениловая кислота при нейтральных значениях рН имеет электроотрицательный заряд (является полианионом), БЭ же, в нейтральных растворах, находится в катионной форме. При сильно кислых значениях рН, вследствие протонирования, имеет место увеличение общего электроположительного заряда БЭ, а также частичная или полная нейтрализация отрицательного заряда poly(dA). За счет этого должны радикально меняться плотности заряда и БЭ, и poly(dA). Исходя из этого можно полагать, что при $\text{pH} \approx 2,5$ БЭ практически не связывается с poly(dA).

При нейтральных значениях раствора ($\text{pH} \approx 7,0$), а также при $\text{pH} \approx 5,5$, БЭ связывается с poly(dA) более слабым способом, чем при $\text{pH} \approx 3,5$. На это указывают значения констант (K), полученных из кривых связывания БЭ с этим полинуклеотидом. В частности, при $\text{pH} \approx 3,5$ - $K = 9.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, при $\text{pH} \approx 7,0$ и $\text{pH} \approx 5,5$ - $K = 8.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Очевидно, что значение константы связывания БЭ с poly(dA) при $\text{pH} \approx 3,5$ на порядок больше, чем при $\text{pH} \approx 7,0$ и $\text{pH} \approx 5,5$.

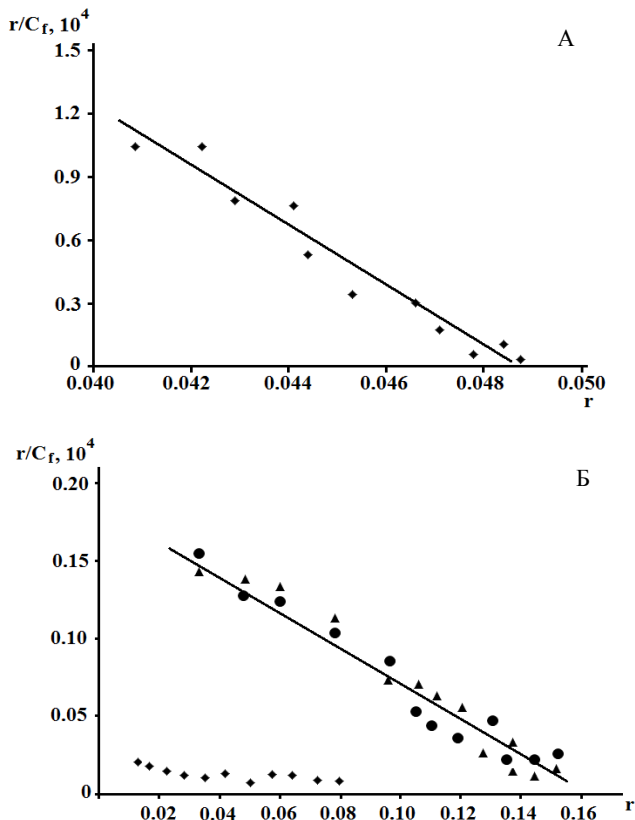


Рис. 4. Кривые связывания БЭ с двухцепочечной poly(dA) при $\text{pH} \approx 3,5$ (А) и с одноцепочечной poly(dA) при $\text{pH} \approx 7,0$, $\text{pH} \approx 5,5$ и $\text{pH} \approx 2,5$ (В). • соответствуют экспериментальным точкам, полученным при $\text{pH} \approx 7,0$; ▲ - при $\text{pH} \approx 5,5$, ♦ - при $\text{pH} \approx 2,5$.

Более того, значение n также намного больше при $\text{pH} \approx 3,5$ - $n \approx 10,5-11,0$, чем при $\text{pH} \approx 7,0$ и $\text{pH} \approx 5,5$ - $n \approx 3,5-4,0$. Это значение n также больше, чем при связывании

БЭ с двухцепочечной ДНК сильным способом ($n \approx 5-6$). При $pH < 4,0$ poly(dA) переходит в двухцепочечное состояние при протонировании адениловых оснований. Исходя из этого, мы полагаем, что полученные значения K и n при связывании БЭ с poly(dA) при $pH \approx 3,5$, несмотря на то, что отличаются от таковых, полученных для комплексов БЭ-ДНК, тем не менее соответствуют интеркаляционному способу связывания. На это указывает и то, что число мест связывания на этом полинуклеотиде сильно ограничено. Тот факт, что значение K при интеркаляции БЭ в poly(dAN⁺)-poly(dAN⁺) отличается от такового, полученного при связывании этого лиганда с двухцепочечной ДНК, по всей вероятности, обусловлен тем, что при $pH \approx 3,5$ протонирование приводит к уменьшению электроотрицательного заряда poly(dAN⁺)-poly(dAN⁺), вследствие чего эта неканоническая спираль приобретает более уплотненную упаковку, по сравнению с ДНК. С другой стороны, молекулы БЭ также протонируются в этих условиях ($pK_a \approx 5,5$ для БЭ) и их общий электроположительный заряд увеличивается (Jones & Wilson 1981). Вследствие указанных эффектов, при интеркаляции БЭ в poly(dAN⁺)-poly(dAN⁺) существенную роль будет играть электростатическое взаимодействие, которое, при нейтральных растворах способствует интеркаляции (Lane & Jenkins 2000, Chaires 2006).

С этой точки зрения, в случае poly(dAN⁺)-poly(dAN⁺) электростатическое взаимодействие должно затруднять процесс интеркаляции, поэтому и значение константы связывания уменьшается. Кроме того, показано, что БЭ предпочитательнее интеркалирует в пиримидин-пуриновые последовательности, по сравнению с пурин-пиримидиновыми последовательностям (Кантор, Шимелл, 1985). Poly(dAN⁺)-poly(dAN⁺) является двухцепочечной спиралью, состоящей из пуриновых оснований, вследствие чего, по всей вероятности, интеркаляционные места для молекул БЭ становятся ограниченными.

При $pH \approx 7,0$ и $pH \approx 5,5$ значения K при связывании БЭ с poly(dA) на порядок меньше, чем при $pH \approx 3,5$. Этот факт обусловлен тем, что этот полинуклеотид в этих условиях находится в одноцепочечном состоянии и полная интеркаляция молекул БЭ при этом невозможна. Тем не менее, мы полагаем, что с оц-poly(dA), как и в случае оц-ДНК или оц-poly[d(A-T)] БЭ связывается полуинтеркаляционным способом. Этот факт подтверждается и тем, что значения K и n находятся в хорошем соответствии с теми же величинами, полученными для полуинтеркаляционных комплексов этого лиганда и с оц-ДНК, и с оц-полинуклеотидами (Vardevanyan 2005). При этом, как видно из рис. 4 Б, БЭ с одинаковым сродством связывается с оц-poly(dA) полуинтеркаляционным способом как при нейтральном, так и слабо кислых значениях pH, несмотря на то, что при $pH \approx 5,5$ молекулы лиганда протонированы.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что в зависимости от pH раствора, БЭ с poly(dA) связывается интеркаляционным или полуинтеркаляционным способом, в зависимости от структурного состояния этого полинуклеотида. Эти данные могут стать фундаментом для оценки структур различных полинуклеотидов, не имеющих каноническое строение. Из полученных данных также выявляется, что механизмы связывания БЭ являются универсальными и практически не зависят от условий среды.

Исследование связывания БЭ с poly(G) при различных ионных силах раствора: Одним из неканонических форм НК являются четырехцепочечные структуры. Такую структуру, в частности имеет полигуаниловая кислота, превращаясь в poly(G)₄ при близких к физиологическому, ионных силах раствора ($I \geq 0.1$ М). Исследования по

взаимодействию лигандов с $\text{poly}(\text{G})_4$ относительно малочисленны, несмотря на то, что эта структура полигуаниловой кислоты имеет важное биологическое значение в клетке. Спектроскопическими методами, нами исследовано связывание БЭ с $\text{poly}(\text{G})_4$ при ионных силах раствора 0.11, 0.31 и 0.51 М. Спектральные характеристики (изменения спектров абсорбции и флуоресценции) комплексов БЭ- $\text{poly}(\text{G})_4$ аналогичны таковым, полученным для комплексов БЭ с указанными выше нуклеиновыми кислотами. При этом, исследования проведены при температурах 293^oК, 298^oК и 300^oК, для определения также величины термодинамических параметров связывания. С этой целью на основании спектров поглощения и флуоресценции получены g/C_f и g и построены кривые связывания при указанных ионных силах раствора и температур (кривые связывания БЭ с $\text{poly}(\text{G})_4$ в координатах Скетчарда схожи с таковыми для комплексов этого лиганда с исследованными НК, поэтому не приводятся). Из этих кривых определены значения K и n , а также ΔG , ΔH и ΔS по стандартным формулам (Lane, Jenkins, 2000). Выявлено, что $\Delta H \approx -2.2$ ккал/моль, что примерно в три раза меньше, чем в случае интеркаляционного связывания БЭ с двухцепочечными НК.

На основании полученных данных нами выявлено, что при указанных условиях БЭ с $\text{poly}(\text{G})_4$ связывается полуинтеркаляционным способом. На это указывает тот факт, что значения K и n , а также ΔG , ΔH и ΔS соответствуют таковым, полученным для комплексов БЭ с одно- или двухцепочечной ДНК при полуинтеркаляционном способе связывания.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что способы связывания БЭ с НК зависят от структурного состояния последних. В частности, при плотноупаковке структуры НК, интеркаляция БЭ затрудняется, и основным становится полуинтеркаляционный способ связывания этого лиганда с $\text{poly}(\text{G})_4$.

Заключение

В работе исследованы особенности связывания классического интеркалятора БЭ с синтетическими двухцепочечными полинуклеотидами $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$, $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]\text{-poly}[\text{d}(\text{A-T})]$, одноцепочечным $\text{poly}(\text{dA})$ и четырехцепочечным $\text{poly}(\text{G})_4$. Результаты исследованый выявили, что особенности связывания БЭ зависят от типа оснований и структуры полинуклеотида. В частности получено, что этот лиганд связывается с двухцепочечным $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]\text{-poly}[\text{d}(\text{A-T})]$ тремя способами: интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим, в то время как с двухцепочечным $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$ – двумя способами: интеркаляционным и полуинтеркаляционным, несмотря на то, что оба полинуклеотида состоят из однотипных оснований.

Другой важной особенностью является то, что значения констант связывания БЭ с этими полинуклеотидами интеркаляционным или полуинтеркаляционным способами различаются: в случае $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]\text{-poly}[\text{d}(\text{A-T})]$ значения K обоих способов больше, чем в случае $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$ и находится в соответствии со значениями K , полученными при комплексообразовании БЭ с ДНК. Также выявлено, что связывание БЭ с $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$ указанными способами носит кооперативный характер, в то время как с $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]\text{-poly}[\text{d}(\text{A-T})]$ кооперативность не проявляется.

Этот факт обусловлен тем, что poly(dA)-poly(dT) более гидратирован и имеет более жесткую структуру, вследствие чего интеркаляция молекул БЭ в плоскость между двумя соседними парами оснований этого полинуклеотида затрудняется.

Показано, что, в зависимости от рН раствора и структурного состояния poly(dA), БЭ с ним связывается различными способами. Значения K при связывании БЭ с poly(dA) рН \approx 7,0 и рН \approx 5,5 примерно на порядок меньше, чем при рН \approx 3,5, а при рН \approx 2,5 БЭ практически не связывается с этим полинуклеотидом. Выявлено, что при рН \approx 3,5 значение K совпадает со значением этого параметра, соответствующего интеркаляционному способу связывания БЭ с двухцепочечной ДНК и poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], а при рН \approx 7,0 и рН \approx 5,5 значения K соответствуют полуинтеркаляционному способу связывания.

Исследовано связывание БЭ с poly(G)₄, который, при близких к физиологическим, ионных силах раствора, находится в четырехцепочечном состоянии. Выявлено, что с этой структурой БЭ в основном связывается полуинтеркаляционным способом, поскольку полученные при этом величины термодинамических параметров находятся в хорошем соответствии с аналогичными значениями, соответствующими связыванию БЭ указанным способом с одно- или двухцепочечной ДНК.

ВЫВОДЫ

1. Методом математической обработки спектров комплексов лиганда с ДНК подтвержден факт существования изобестической точки и с высокой точностью определена ее локализация. Для случая комплексов БЭ с ДНК изобестическая точка обнаруживается при $\lambda = 510$ нм. В случае комплексов МС с ДНК изобестическая точка не обнаруживается.
2. Выявлено, что взаимодействие БЭ с полинуклеотидом зависит от последовательности однотипных оснований: для комплексов БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] имеет место связывание тремя способами - интеркаляционным, полуинтеркаляционным и слабым (электростатическим). В случае с poly(dA)-poly(dT) имеет место связывание двумя способами – интеркаляционным и полуинтеркаляционным.
3. Обнаружено, что значения констант связывания БЭ с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] и poly(dA)-poly(dT) интеркаляционным ($K_{и}$) и полуинтеркаляционным ($K_{пн}$) способами различаются; для poly(dA)-poly(dT) они в два раза меньше, чем для poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)].
4. Показано, что связывание БЭ с полинуклеотидами зависит от их структурного состояния: в случае плотноупакованного полинуклеотида poly(dA)-poly(dT) носит кооперативный характер, в то время как с poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] кооперативность не проявляется и связывание БЭ с этим полинуклеотидом носит такой же характер, как с ДНК.
5. Получено, что БЭ с poly(dA) связывается различными способами в зависимости от pH раствора. В интервале $3.0 \leq \text{pH} \leq 4.0$ параметры связывания БЭ с poly(dA) соответствуют интеркаляционному способу, что указывает на то, что полинуклеотид в этих условиях находится в двухцепочечном состоянии. В интервале $4.0 \leq \text{pH} \leq 7.0$ значения параметров связывания соответствуют полуинтеркаляционному способу, что указывает на то, что полинуклеотид находится в одноцепочечном состоянии.
6. Связывание БЭ с poly(G)₄ происходит по полуинтеркаляционному механизму, так как значения термодинамических параметров комплексов poly(G)₄-БЭ находятся в хорошем соответствии с аналогичными параметрами для этого способа связывания лиганда с ДНК.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Minasyants M.V., Investigation of the differential absorption of DNA complexes with ligands. Proceedings of the Yerevan State University. Chemistry and Biology, N1, 2014, p. 51-57.
2. Варdevанян П.О., Элбакян В.Л., Шагинян М.А., Минасянц М.В., Парсаданян М.А., Саакян Н.С. Определение изобестической точки спектров поглощения комплексов ДНК с бромистым этидием, Журнал прикладной спектроскопии, 81, N6, 2014, с. 970-973.
3. Mukhaelyan Zh.H., Antonyan A.P., Minasyants M.V., Investigation of acidic denaturation of ethidium bromide complexes with DNA. Proceedings of the Yerevan State University. Chemistry and Biology, N2, 2014, p. 48-53.
4. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V., Ethidium Bromide Interaction with Poly(G). Biophysical Reviews and Letters, v. 9, N3, 2014, p. 239–247.
5. Vardevanyan P.O., Minasyants M.V., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P. Multimodal interaction of Hoechst 33258 minor groove binder and ethidium bromide intercalator with DNA, Biolog. Journal of Armenia, v. 66, N 1, 2014, p. 59-65.
6. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V. Spectral Characteristics of DNA-EtBr and DNA-MB Complexes, J. of Biomol. Struct. & Dyn., Albany 2015, The 19th Convers., June 9-13, p. 87.
7. Antonyan A.P., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O. Study of poly(dA) structure in the acidic media, Biolog. Journal of Armenia, v. 67, N 2, 2015, p. 29-35.
8. Варdevанян П.О., Антопян А.П., Парсаданян М.А., Минасянц М.В. Спектры поглощения и флуоресценции комплексов полинуклеотидов с бромистым этидием. Известия НАН РА Физика, т. 50, N4, 2015, с. 511-519.

Մինսայանց Միքայել Վահանի

Մինթետիկ պոլիմուկլեոտիդների հետ էթիդիում բրոմիդի կապման առանձնահատկությունները

Ամփոփագիր

Հանգուցային բառեր՝ էթիդիումի բրոմիդ, իզոբետաիկ կետ, ինտերկալյացիա, կիսահինտերկալյացիա, կլանման սպեկտրներ, սինթետիկ պոլիմուկլեոտիդներ, ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներ

Աշխատանքում առաջարկված է մաթեմատիկական մոդել, որը թույլ է տալիս հայտնաբերել իզոբետաիկ կետ (ԻԿ) ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում: Առաջարկված մոդելի միջոցով վերլուծվել են ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները և հաստատվել է ԻԿ-ի գոյությունը այդ սպեկտրներում, ինչպես նաև մեծ ճշգրտությամբ որոշվել է այդ կետին համապատասխանող պլեքի երկարությունը: Նաև ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում ձևավորվում է կեղծ իզոբետաիկ կետ:

Աշխատանքում ուսումնասիրված են տարբեր ազոտային հիմքեր պարունակող սինթետիկ պոլիմուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները: Բացահայտվել է, որ ադենինային և թիմինային ազոտային հիմքերով նուկլեոտիդներից կազմված պոլիմուկլեոտիդները ունեն տարբեր կառուցվածքներ, եթե դրանց նուկլեոտիդային հաջորդականությունները տարբեր են, ինչը պայմանավորում է դրանց հետ լիզանդի կապման բնույթը: Այսպես, ստացված տվյալներից բացահայտվում է, որ երկշղթա $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ -ի հետ ԷԲ-ը կապվում է առնվազն երեք եղանակներով՝ ինտերկալյացիոն, կիսահինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ, մինչդեռ $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ի հետ այդ լիզանդը կապվում է երկու եղանակներով՝ ինտերկալյացիոն և կիսահինտերկալյացիոն: Ընդ որում, այդ երկու պոլիմուկլեոտիդների հետ միևնույն մեխանիզմով կապման հաստատունների արժեքները տարբերվում են. $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ի դեպքում K-ի արժեքը ավելի փոքր է, քան $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ -ի դեպքում: Այս փաստը պայմանավորված է նրանով, որ $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ն ավելի հիդրատացված է, որի հետևանքով ունի ավելի կոշտ կառուցվածք, քան $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ -ն, ինչն էլ դժվարացնում է ինտերկալյատորի մոլեկուլների ներթափանցումը հիմքերի գույգերի հարթությունների մեջ: $\text{Poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ի մյուս առանձնահատկությունը կայանում է նրանում, որ դրա հետ ԷԲ-ի թույլ, էլեկտրաստատիկ մեխանիզմով փոխազդեցությունը չի հայտնաբերվում:

Հայտնաբերվել է նաև, որ $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը կոոպերատիվ է, որը, որոշ դեպքերում կարող է ունենալ

կարևոր կենսաբանական նշանակություն, մասնավորապես, նպաստել բջջում ԴՆԹ-ի գործառույթների ավելի նուրբ մոդուլացմանը:

Նաև հայտնաբերվել է, որ լուծույթի pH-ից կախված՝ poly(dA) պոլինուկլեոտիդը կարող է գտնվել կառուցվածքային տարբեր վիճակներում՝ երկշղթա pH \approx 3,5-ում և միաշղթա pH \approx 7,0, pH \approx 5,5 և pH \approx 2,5 պայմաններում: Ստացված է նաև, որ ԷԲ-ը poly(dA)-ի հետ փոխազդում է ինտերկալացիոն կամ կիսահինտերկալացիոն եղանակներով՝ կախված պոլինուկլեոտիդի կառուցվածքից: Ստացված տվյալները նաև բացահայտում են, որ նուկլեինաթթուների հետ դասական ինտերկալատոր ԷԲ-ի փոխազդեցության մեխանիզմները ունիվերսալ են և դրանց դրսևորումը կախված չէ միջավայրի պայմաններից:

Ստացվել են նաև քառաշղթա poly(G)-ի կապման պարամետրերի K-ի, ΔG -ի և ΔS -ի, ինչպես նաև ΔH -ի արժեքները, որոնք սակայն չեն համընկնում ԷԲ-ի ինտերկալացիոն եղանակով փոխազդեցությանը համապատասխանող արժեքների հետ, սակայն լավ համապատասխանության մեջ են երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ այդ լիգանդի կիսահինտերկալացիոն եղանակով փոխազդեցության ջերմադինամիկ պարամետրերի արժեքների հետ: Հաշվարկները ցույց են տալիս, որ poly(G)₄-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության դեպքում n=4 (մեկ նուկլեոտիդի հաշվարկով):

Հայտնի է, որ երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության համար n=5 (գույգ նուկլեոտիդ): Հետևաբար, ի տարբերություն կրկնակի պարուրային նուկլեինաթթուների, քառաշղթա պոլինուկլեոտիդներում ԷԲ-ի մեկ մոլեկուլը կապվում է ավելի փոքր թվով ազոտային հիմքերի հետ: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ համեմատաբար մեծ իոնական ուժերի դեպքում՝ 0.11 մոլ և ավելի, poly(G)₄-ն գտնվում է քառաշղթա վիճակում: Մյուս կողմից, ԷԲ-ի հետ փոխազդեցության դեպքում poly(G)₄-ն կառուցվածքային զգալի փոփոխությունների չի ենթարկվում, ընդ որում, ջերմադինամիկ պարամետրերի՝ ΔG -ի, ΔH -ի և ΔS -ի արժեքները գրեթե կախված չեն իոնական ուժից, ինչը վկայում է այն մասին, որ poly(G)₄-ն նշված պայմաններում գտնվում է քառաշղթա վիճակում:

Features of ethidium bromide binding with synthetic polynucleotides

Summary

Key words: ethidium bromide, isosbestic point, intercalation, semi-intercalation, absorption spectra, synthetic polynucleotides, fluorescence spectra

In this work the mathematical model has been suggested which permits revealing an isosbestic point (IP) on the absorption spectra of DNA-ligand complexes. The absorption spectra of DNA-EtBr complexes were analyzed through the suggested model and it was maintained the existence of IP on these spectra, as well as the wavelength corresponding to this point was determined with high precision. It was also shown that the pseudo-isosbestic point is appeared on the absorption spectra of DNA-MB complexes.

In this work the peculiarities of EtBr interaction with synthetic polynucleotides containing different azotic bases have been studied. It was revealed that the polynucleotides consisting of nucleotides with adenine and thymine azotic bases have different structures when their nucleotide sequences are different, which conditions their binding character with ligands. Thus, it is shown from the obtained data that EtBr binds to double-stranded poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] at least by three modes – intercalation, semi-intercalation and electrostatic, while it binds to poly(dA)-poly(dT) by two modes – intercalation and semi-intercalation. Moreover, values of the binding constants of this ligand to both polynucleotides with the same mechanism differ: in the case of poly(dA)-poly(dT) the value of K is less than in the case of poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]. This is conditioned by the fact that poly(dA)-poly(dT) is more hydrated due to which it has more rigid structure than poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] which in turn hinders the permeation into spaces between base pairs. Another peculiarity of poly(dA)-poly(dT) is that the interaction with EtBr by electrostatic mechanism is not revealed.

It was also revealed that EtBr interaction with poly(dA)-poly(dT) is cooperative which in some cases may have an important biological significance, particularly, it contributes to more delicate modulation of DNA functions in a cell.

It was also found out that depending on the solution pH, poly(dA) polynucleotide may be in various structural states: double-stranded in $\text{pH}\approx 3.5$ and single-stranded in $\text{pH}\approx 7.0$, $\text{pH}\approx 5.5$ and $\text{pH}\approx 2.5$ conditions. It was obtained as well that EtBr interacts with poly(dA) by intercalation and semi-intercalation modes depending on polynucleotide structure. The obtained data also reveal that the interaction mechanisms of classic intercalator EtBr with nucleic acids are universal and their appearing does not depend on medium conditions.

The values of the binding parameters K , ΔG , ΔS as well as ΔH with four-stranded poly(G) were obtained but they do not coincide with those of EtBr interaction by intercalation mode, moreover, they are in good correspondence to the values of thermodynamic parameters of EtBr interaction by semi-intercalation mode. The calculations have shown that in the case of EtBr interaction with poly(G)_4 $n=4$ (per one nucleotide).

It is known that for EtBr interaction with double-stranded nucleic acids $n=5$ (pair of nucleotides). Consequently, in spite of double helical nucleic acids, in four-stranded polynucleotides one molecule of EtBr binds to less number of azotic bases. The obtained results permit concluding that at relatively high ionic strengths – 0.11 M and more, poly(G)_4 is in four-stranded state. On the other hand, in the case of EtBr interaction, poly(G)_4 does not subjected to relevant structural changes, moreover, the values of thermodynamic parameters – ΔG , ΔH and ΔS do not almost depend on the ionic strength which indicates that poly(G)_4 is in four-stranded state in the mentioned conditions.