

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼ ՍԱՐԱՆ
ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ՖԱԿՈՒԼՏԵՏ
ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱՅԻ ԱՄԲԻՈՆ

ՄԻՆԱՍՅԱՆՑ ՄԻՔԱՅԵԼ ՎԱՅԱՆԻ

**ՄԻՆԹԵՏԻԿ ՊՈԼԻՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ ՀԵՏ ԷԹԻԴԻՈՒ ՄԻ
ԲՐՈՄԻԴԻ ԿԱՊՍԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՐԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅՈՒՆ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա մասնագիտու էթյամբ
Կենսաբանական գիտու էթյու էնտերի թեկնածու է
գիտական աստիճանի հայցման համար

Գիտական ղեկավար,
Կենսաբանական գիտու էթյու էնտերի դոկտոր,
պրոֆեսոր Պ.Յ. Վարդևանյան

ԵՐԵՎԱՆ 2016

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ.....4

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԿՆԱՐԿ8

1.1. Լիգանդների հավասարակշռական միացումը մակրոմոլեկուլների հետ.....8

1.1.1. Ոչ մեծ մոլեկուլների կամ իոնների փոխազդեցությունը մակրոմոլեկուլների հետ9

1.1.2. Ուղղաձիծ կախվածության Սկետչարդի մեթոդը10

1.1.3. Կապման մեծ թվով տեղերի վերլուծությունը: Իրարից անկախ, իրար համարժեք տեղեր12

1.1.4. Կապման համարժեք տեղերի միջև փոխազդեցությունը: Կոոպերատիվ և հակակոոպերատիվ փոխազդեցություններ13

1.2. Ինտերկալյատորների փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ18

1.2.1. ԷԲ-ի փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ.....21

1.3. ԴՆԹ-ի ոչ կանոնիկ կառուցվածքները29

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ39

2.1. Օգտագործված պրեպարատները39

2.2. Օգտագործված սարքավորումները39

2.3. Նուկլեինաթթուների հետ Լիգանդների կոմպլեքսների պատրաստումը40

2.4. Նուկլեինաթթուների հետ Լիգանդների կոմպլեքսների սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունը41

2.5. Կապման կորերի կառուցումը Սկետչարդի կոորդինատներով42

2.6. ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների ջերմա- և pH-իրաւիւթւած պարունայր-կծիկ անցման ուսումնասիրութեան սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդը43

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ45

3.1. ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսի պարունայր-կծիկ անցումը45

3.2. ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների փոխազդեցութեան սպեկտրասկոպիկ հետազոտութեան ներքին57

3.2.1. ԴՆԹ-ի հետիւտերկալյաւ աստրներ ԷԲ-ի և ՄԿ-ի կոմպլեքսների սպեկտրների առանձնահատկութեան ներքին58

3.2.2. Իզոբեստիկ կետի ուսումնասիրութեանը ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում66

3.2.3. Իզոբեստիկ կետի ճշգրտումը ԴՆԹ-ի հետիւտերկալյաւ աստրների կլանման սպեկտրներում72

3.3. ԷԲ-ի փոխազդեցութեանը ադենինային և թիմինային նուկլեոտիդներից կազմված հոմոպուրինուկլեոտիդների հետ75

3.3.1. Poly(dA)-poly(dT)-ի և poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները78

3.3.2. Poly(A)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցութեան առանձնահատկութեան ներքին չեզոք և թթվային պայմաններում84

3.3.3. ԷԲ-ի փոխազդեցութեանը poly(G)-ի հետ88

ԵՃՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆ98

ԵՃՐԱՅԱՆԳՈՒՄՆԵՐ1

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Խնդրի արդիականությունը. Գեների գործառույթը բջջում կարգավորվում է տարբեր բնույթի լիգանդների հետ ԴՆԹ-ի փոխազդեցության միջոցով: Ընդ որում, լիգանդները կենդանի բջիջներում ծառայում են որպես գործիքներ, ինչը թույլ է տալիս պահպանել գենետիկական տեղեկատվությունը, ինչպես նաև ճիշտ ժամանակին իրացնել այն [1,2].

Ֆիզիկական և քիմիական գործոնների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի կառուցվածքի և կառուցվածքային անցումների վրա բավականաչափ լավ է ուսումնասիրված, սակայն նույն եռոտիդային հաջորդականության դերը ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիոն փոխարկումների գործընթացում լիովին ուսումնասիրված չէ: Մինչդեռ, նույնատիպ նույն եռոտիդային հաջորդականություններից կազմված տեղամասերը բնական ԴՆԹ-ում կարող են ունենալ կարևոր և որոշիչ ազդեցություն ԴՆԹ-ի ֆունկցիաների իրականացման և լիգանդների կապման պրոցեսներում: Յետևաբար, հետազոտությունները, որոնք առնչվում են տարբեր նույն եռոտիդային կազմով սինթետիկ պոլինուկլեոտիդների հետ լիգանդների փոխազդեցություններին՝ հանդիսանում են արդիական: Այս հարցերը ձեռք են բերում լրացուցիչ կարևորություն, երբ հաշվի է առնվում այն փաստը, որ բացի միաշղթա (առաջնային) և երկշղթա (երկրորդային) կառուցվածքներից, ԴՆԹ-ն կարող է ունենալ նաև երրորդային և չորրորդային կառուցվածքներ: ԴՆԹ-ի այս ոչ կանոնավոր կառուցվածքները մեծապես կախված են նույն եռոտիդային հաջորդականություններից:

ԴՆԹ-ի հետազոտություններում կարևոր հարց է նաև տարբեր ցածրամոլեկուլային միացությունների ազդեցությունը դրա կառուցվածքի և ֆունկցիաների վրա [3]: Այդ հարցը արդիական է, քանի որ բջջում ԴՆԹ-ն շրջապատված է տարբեր անօրգանական և օրգանական մոլեկուլներով, որոնք ուղղակիորեն կամ անուղղակի ազդում են դրա տարածական կառուցվածքի վրա և այդպիսով խթանում կամ արգելակում են վերջինիս ֆունկցիոնալ ակտիվությունը [4,5]: Ավելին, լիգանդները հանդիսանում են ԴՆԹ-ի արդյունավետ

սենսորներ տարբեր նմուշներում, որոնցում ԴՆԹ-ն պարունակվում է նանոմոլային կոնցենտրացիաներով: Ընդ որում, հնարավոր է անջատել ԴՆԹ-ի ֆրագմենտեր, որոնք պարունակում են ընդհամենը 100 գույգ նուկլեոտիդներ [6]:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները. Աշխատանքի նպատակն է ԴՆԹ-ի տարբեր կառուցվածքների հետ դասական ինտերկալյատոր ԷԲ-ի միացման մոլեկուլային մեխանիզմների բացահայտումը:

Նպատակի իրականացման համար առաջ ադրվել են հետևյալ խնդիրները .

- ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյատոր լիգանդների կոմպլեքսների սպեկտրալ բնութագրերի հետազոտությունը;
- ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում առկա իզոբեստիկ կետի վարքի ուսումնասիրումը;
- ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կլանման և դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրների վերլուծությունը;
- poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] և poly(dA)-poly(dT) հաջորդականությունների հետ ԷԲ-ի միացման ուսումնասիրությունը և կապման պարամետրերի՝ K-ի և n-ի որոշումը;
- poly(dA) հոմոպոլիմերի նուկլեոտիդի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը՝ լուծույթի pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում և այդ պոլիմերի կառուցվածքային առանձնահատկությունների գնահատումը;
- poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի կապման հաստատունի K-ի և լիգանդի կապված մեկ մոլեկուլին համապատասխանող ազոտային հիմքերի թվի՝ n-ի որոշումը՝ լուծույթի pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում;
- քառազղթա poly(G)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը լուծույթի տարբեր իոնական ուժերում և թերմոդինամիկ պարամետրերի որոշումը:

Աշխատանքի գիտական նորոշումը. Ատենախոսական աշխատանքի արդյունքները նոր հնարավորություններ են ընձեռում ՆԹ-ի (նուկլեինաթթուների) հետ լիգանդների փոխազդեցության ուսումնասիրությունում: Մասնավորապես, աշխատանքում առաջին անգամ ստացված են տվյալներ ԴՆԹ-ի նտերկալյատոր լիգանդների կլանման սպեկտրներում իզոբեստիկ կետի դերի մասին: Կարևոր արդյունքներից մեկն այն է, որ այդպիսի կետի

առկայությունը թույլ է տալիս միանշանակ հաստատել կապման ինտերկալյացիոն մեխանիզմի գոյության փաստը: Կարևոր են նաև նույնատիպ նուկլեոտիդներ պարունակող, սակայն տարբեր հաջորդականություն ունեցող հոմոպոլինուկլեոտիդների հետ էԲ-ի փոխազդեցության համար ստացված արդյունքները: Այդ հոմոպոլինուկլեոտիդները, կախված միջավայրի պայմաններից, կարող են ձեռք բերել տարբեր, ոչ կանոնավոր կառուցվածքներ, ինչը էապես ազդում է էԲ-ի հետ դրանց փոխազդեցության վրա: Մասնավորապես, պարզվել է, որ էԲ-ը կապվում է poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ ոչ կոոպերատիվորեն, ինչպես բնական ԴՆԹ-ի դեպքում, մինչդեռ poly(dA)-poly(dT) հետ էԲ-ի կապումը տեղի է ունենում կոոպերատիվորեն: Սա պայմանավորված է այդ պոլինուկլեոտիդների կառուցվածքով: Ցույց է տրված նաև, որ poly(dA)-ն կարող է գտնվել տարբեր կառուցվածքային վիճակներում՝ կախված այս մոլեկուլի պրոտոնացման աստիճանից: Լուծույթի pH-ի փոփոխության որոշակի միջակայքում ($7.0 > \text{pH} \geq 4.0$) այս պոլինուկլեոտիդը գտնվում է միաշղթա վիճակում, մինչդեռ pH-ի մեկ այլ միջակայքում ($4.0 > \text{pH} \geq 3.0$) այն գտնվում է երկշղթա վիճակում, իսկ $\text{pH} < 3.0$ արժեքների դեպքում այս մոլեկուլը գտնվում է միաշղթա վիճակում: Հետազոտության արդյունքները նաև բացահայտում են, որ poly(G)-ի հետ, որը $I \geq 0.1$ մոլ իոնական ուժով լուծույթում գտնվում է քառաշղթա վիճակում, էԲ-ն, ինչպես ԴՆԹ-ի միաշղթա և երկշղթա ձևերի դեպքում, կապվում է կիսաինտերկալյացիոն եղանակով:

Գործնական նշանակությունը. Ստացված արդյունքները արժեքավոր են և կարող են ունենալ կիրառական նշանակություն, քանի որ դրանք բացահայտում են ԴՆԹ-ի տարբեր կառուցվածքների հետ էԲ-ի կապման որոշ առանձնահատկություններ՝ կախված նուկլեինաթթվի նուկլեոտիդային կազմից և հաջորդականությունից, ինչպես նաև միջավայրի պայմաններից: Այդ արդյունքները կարևոր են նաև այն առումով, որ դրանք կարող են օգտակար լինել նոր միացությունների մշակման և սինթեզի համար: Աշխատանքի փորձարարական տվյալները նոր հնարավորություններ են ընձեռում այս ոլորտում հետագա հետազոտությունների համար: Ստացված տվյալները կարող են օգտագործվել ԵՊՀ համապատասխան

ամբիոնների դասախոսական ծրագրերում, ինչպես նաև այն
լաբորատորիաներում, որոնք հետազոտում են ԴՆԹ-ի հետ
լիզանդների փոխազդեցությունները:

Աշխատանքի փորձաքննությունը. Ատենախոսության նյութերը
գեկուցվել և քննարկվել ԵՊՀ-ի Կենսաաֆիզիկայի ամբիոնում,
ինչպես նաև հետևյալ գիտական կոնֆերանսներում. International
Conference “Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior”, Yerevan, 2013;
The 18th and 19th Conversation, Albany (USA) 2013.

Յրապարակված աշխատանքներ. Ատենախոսության թեմայով
հրապարակվել են 8 գիտական աշխատանքներ:

Աշխատանքի կառուցվածքը. Ատենախոսական աշխատանքը կազմված է
ներածությունից, գրականության ակնարկից, փորձարարական
մասից, ստացված արդյունքներից և դրանց քննարկումից,
եզրակացությունից, եզրահանգումներից, օգտագործված
գրականության ցանկից, որի մեջ ներառվում են 151 անուն
հղումներ: Աշխատանքում ներկայացված են 23 նկարներ, 1 աղյուսակ:
Այն շարադրված է 119 տպագրական էջի վրա:

ԳԼՈՒԽ 1.

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

1.1. Լիգանդների հավասարակշռական միացումը մակրոմոլեկուլների հետ

ԴՆԹ-ի հետ Լիգանդների կոմպլեքսների առաջացման ջերմադինամիկայի հիմնախնդիրներից է այն գործընթացների և պայմանների պարզաբանումը, որոնք որոշիչ են ԴՆԹ-ի նկատմամբ Լիգանդների խնամակցության և սպեցիֆիկության համար: Այդ առումով, անհրաժեշտ է ազատ էներգիայի փոփոխությունը վերլուծել առանձին բաղադրիչների, որոնցից յուրաքանչյուրը կախված է այդ գործընթացների վրա ազդող որոշակի գործոնից: Դրանք են ազատ էներգիայի էլեկտրաստատիկ, Վան-դեր-Վաալսյան, հիդրոֆոբ փոխազդեցություններին, ջրածնական կապերին և հիդրատացման ուժերին համապատասխանող բաղադրիչները: $\Delta G_{կոմպ}$ և $\Delta H_{կոմպ}$ փորձարարական արժեքները կարելի է ստանալ անմիջականորեն, ընդ որում, $\Delta G_{կոմպ}$ -ի որոշման համար կիրառվում են այն նույն մոտեցումները, ինչպես ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի առաջացման դեպքում: Սակայն Լիգանդների հետ ԴՆԹ-ի կոմպլեքսների առաջացման ժամանակ $\Delta G_{կոմպ}$ -ի բաղադրիչների որոշման համար պետք է կիրառել այլ մոտեցում:

Էլեկտրաստատիկ գործոնի դերը կարելի է գնահատել՝ ԴՆԹ-ի հետ տվյալ Լիգանդի խնամակցությունը ուսումնասիրելով տարբեր իոնական ուժերով Լուծույթներում [3,7]: ԴՆԹ-ի հետ Լիգանդների կոմպլեքսագոյացման պրոցեսում Վան-դեր-Վաալսյան փոխազդեցությունները կարելի է ներկայացնել որպես ջրի հետ կոմպլեքսների առանձին բաղադրիչների փոխազդեցությունների գումար, քանի որ առկա են միևնույն թվով հարմներ նույնատիպ ատոմային խմբերի և ջրի միջև: Ջրածնական կապերի թիվը սպեցիֆիկ կոմպլեքսներում պահպանվում է և կարելի է համարել, որ այդ գործոնը գրեթե ներդրում չունի $\Delta G_{կոմպ}$ -ի արժեքում: Այսպիսով, կապման ազատ էներգիայի մեծության մեջ հիմնական ներդրում

ուև են էլ եկտրաստատիկ, հիդրատացիոն և կոնֆորմացիոն էֆեկտները [3,7]:

Սակայն այդ գործոնները կախված են միմյանցից. օրինակ՝ ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիայի փոփոխությունը հանգեցնում է լիցքի խտության և հիդրատացման աստիճանի փոփոխություններին: Մյուս կողմից, հիդրատացման գործոնի՝ $\Delta G_{(h,h,p)}$ ներդրումը կարելի է գնահատել կոմպլեքսների, ԴՆԹ-ի և լիզանդի չկապված մոլեկուլների՝ լուծիչին մատչելի մակերևույթի (LՄՄ) համեմատման միջոցով [8]:

1.1.1. Ոչ մեծ մոլեկուլների կամ իոնների փոխազդեցությունը մակրոմոլեկուլների հետ

Քիմիական և կենսաքիմիական պրոցեսների մեխանիզմների մասին պատկերացումները հիմնված են մեծ մասամբ հավասարակշռական հաստատունի չափման վրա, երբ մոլեկուլները փոխազդում են իրար հետ: Սովորաբար նման միացությունների փոխազդեցության հիմքում ընկած է մեկ կամ մի քանի ոչ մեծ մոլեկուլների (L) կապումը տվյալ մակրոմոլեկուլի վրա առկա համարժեք թվով տեղերին (E).



որտեղ հավասարակշռական կոնցենտրացիաները բավարարում են հետևյալ հարաբերությանը [8-13].

$$K_L = \frac{[E][L]^n}{[EL_n]} \quad (2)$$

Ընդհանրապես, մակրոմոլեկուլների հետ լիզանդների փոխազդեցության ուսումնասիրություններում հավասարակշռությունը ընդունված է նկարագրել դիսոցման հաստատունի միջոցով:

Մնացած բոլոր դեպքերում հավասարակշռական կապման համար օգտագործվում է ասոցման հաստատունը: Օրինակ՝ միոգլոբինի հետ թթվածնի փոխազդեցության ռեակցիան նկարագրվում է հավասարակշռական կապման հաստատունով [7,9,10].



Ակնհայտ է, որ ասոցման և դիսոցման հաստատունները միմյանց հետ կապված են հակադարձ հարաբերությամբ: Գիբսի ստանդարտ էներգիայի արժեքները ասոցման և դիսոցման համար ունեն տարբեր նշաններ: Ասոցման և դիսոցման համար համապատասխանաբար օգտագործելով A և D նշանակումները, կստանանք [7,9,10].

$$\Delta G_D^0 = -RT \ln K_D = RT \ln \left(\frac{1}{K_D} \right) = RT \ln K_A = -\Delta G_A^0 \quad (4)$$

Քննարկենք մեկ տեղի հետ միացումը, երբ $n=1$ (այսինքն մակրոմոլեկուլի վրա առկա է կապման միայն մեկ տեղ):

Այս դեպքում արոցեսը բնութագրվում է (2)-ով: Հաշվի առնելով, որ մակրոմոլեկուլների հետ լիգանդների հավասարակշռական միացման որոշումը տալիս է 1 մոլ մակրոմոլեկուլի հետ միացած լիգանդի մոլերի թիվը, նպատակահարմար է ներմուծել ϑ պարամետրը, որը որոշվում է հետևյալ հարաբերությամբ.

$$\vartheta = \frac{[EL]}{[EL] + [E]} \quad (5)$$

K_L -ի որոշման մեթոդները հիմնված են (2) և (5) հավասարումների միաժամանակյա որոշման վրա, ընդ որում, հաճախ ϑ -ն կարելի է որոշել փորձարարականորեն [9-13]:

1.1.2. Ուղղագիծ կախվածության Սկետչ արդի մեթոդը

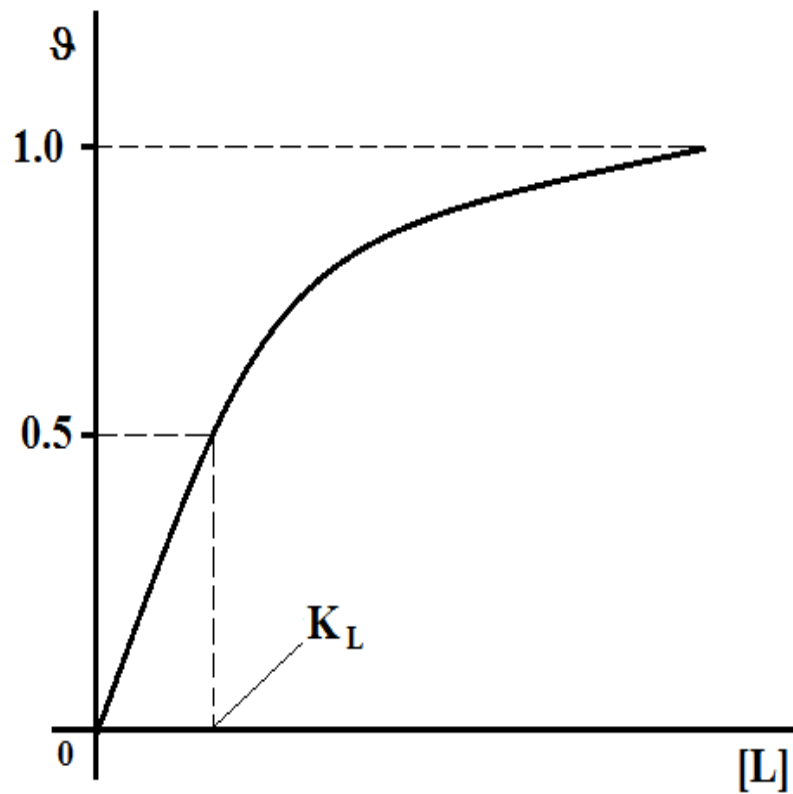
Մակրոմոլեկուլի հետ լիգանդի կապման կորը իրենից ներկայացնում է հիպերբոլ (նկար 1), երբ ϑ -ն որոշվում է կապման հաստատունի և լիգանդի կոնցենտրացիայի միջոցով՝ (2)-ը (5)-ի մեջ տեղադրելիս.

$$\vartheta = \frac{[L]}{K_L + [L]} \quad (6)$$

Հիպերբոլ այն հավասարման գծային ձևափոխության մոտեցում է առաջարկվել Սկետչ արդի կողմից, համաձայն որի (6)-ի երկու կողմերն էլ բաժանվում են $[L]$ -ի վրա.

$$\frac{\vartheta}{[L]} = \frac{1}{K_L} - \frac{\vartheta}{K_L} \quad (7)$$

Այս դեպքում $\mathcal{A}[L]$ -ի՝ \mathcal{A} -ից կախվածության կորը (Սկետչ արդյան կոր) (նկար 2) ուղղագիծ է, որի թեքության անկյան տանգենսը հավասար է $(1/K_L)$ -ին, որտեղ $1/K_L = K_B$ -ն կապման հաստատունն է (այլ ոչ թե դիսոցման հաստատունը) միացման մեկ տեղի դեպքում [9]: K_L -ի որոշման ուղղակի եղանակի դեպքում պահանջվում է փորձարարական տվյալների աննշան ձևափոխություն, սակայն կապման կորը



Նկար 1. Մակրոմոլեկուլի հետ լիգանդի կապման հաստատունի գրաֆիկական որոշման ուղղակի մեթոդը՝ մեկ եղանակով միացման դեպքում [9]:

ստանում է հիպերբոլի տեսք, որի կառուցման համար անհրաժեշտ է լիգանդի կոնցենտրացիայի փոփոխության լայն տիրույթ [9-13]: Սկետչարդի մեթոդը լայնորեն կիրառվում է հատկապես կապման մեկից ավելի տեղերի հետ փոխազդեցության ուսումնասիրություններում: Սակայն Սկետչարդի մեթոդը ավելի հարմար է նաև կապման միայն մեկ տեղի հետ փոխազդեցության վերլուծության համար, քանի որ այն թույլ է տալիս ավելի ճշգրիտ տվյալներ ստանալ լիգանդի կոնցենտրացիայի փոփոխության լայն տիրույթում [7,10]:

1.1.3. Կապման մեծ թվով տեղերի վերլուծությանը: Իրարից անկախ, իրար համարժեք տեղեր

Եթե տվյալ ոչ մեծ մոլեկուլը կամ իոնը կարող է կապվել մակրոմոլեկուլի վրա առկա կապման որևէ համարժեք տեղերից մեկին K_L հաստատունով, ապա զբաղեցված տեղերի թիվը ընդհանուր տեղերի համեմատ կբնութագրվի (5)-ով: Եթե մակրոմոլեկուլի վրա յուրաքանչյուր կապման տեղ բնութագրվում է լիգանդի միացման միևնույն հաստատունով, ապա մեկ մոլեկուլին միացած լիգանդների թիվը կարելի է որոշել ըստ յուրաքանչյուր հատվածին միացած մոլեկուլների միջին թվի.

$$g = \frac{n[L]}{K_L + [L]} \quad (8)$$

Անկախ են այն տեղերը, որոնց դեպքում լիգանդի միացումը տեղերից որևէ մեկին չի ազդում նույն մակրոմոլեկուլում մնացած տեղերի հետ միացման վրա: Այս դեպքում, եթե $n=1$, ապա (8)-ը վերածվում է (5)-ին [7,9,10]:

Իրական դեպքերում կապման տարբեր տեղերը տվյալ մակրոմոլեկուլի վրա բնութագրվում են միացման տարբեր հաստատուններով, օրինակ՝ սպիտակուցի մոլեկուլում տարբեր ամինաթթուներ տարբեր խնամակցություն ունեն սրոտոնների նկատմամբ:

Միացման մեկից ավելի, իրարից անկախ և իրար համարժեք տեղերի դեպքում փոխազդեցությունը նույնպես կարելի է արտահայտել Սկետչ արդյան կորի տեսքով, ընդ որում, մեկ եղանակով փոխազդեցությունը կապման բազմաթիվ տեղերի դեպքում նույնպես ուղիղ գիծ է (նկար 2), իսկ երկու եղանակով փոխազդեցության համար՝ բազմաթիվ, իրարից անկախ, համարժեք տեղերի դեպքում կապման կորը ստորին մասում գոգավոր է [7,9,10]:

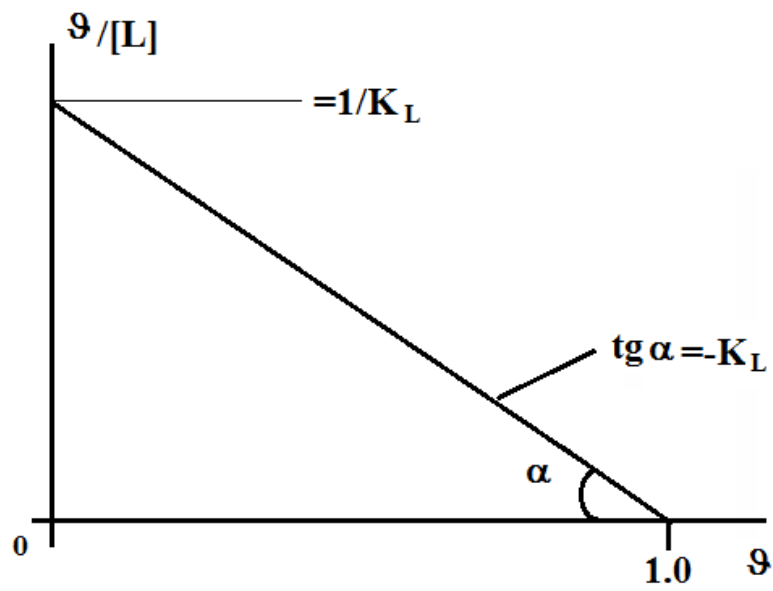
1.1.4. Կապման համարժեք տեղերի միջև փոխազդեցությունը:

Կոոպերատիվ և հակակոոպերատիվ փոխազդեցություններ

Կոոպերատիվ փոխազդեցության կորը խիստ տարբերվում է հիպերբոլից: $y=0$ կետին մոտ հատվածում կորը դեպի վեր բարձրանում է թեթույան փոքր անկյամբ, այնուհետև այն կտրուկ աճում է՝ հասնելով հագեցման $y=1$ կետում (նկար 3): Կոոպերատիվության հիմնական հատկանիշը կորի կտրուկ աճն է, երբ լիգանդի ակտիվությունը 0-ից մեծ է: Ոչ կոոպերատիվ փոխազդեցությունների դեպքում կորը կտրուկ աճում է լիգանդի ցածր ակտիվության դեպքում՝ $y \approx 0$, իսկ մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում, երբ ակտիվությունը նույնպես մեծ է, կորը ձգտում է հագեցման (հիպերբոլ): S-աձև կորի ստացման համար անհրաժեշտ են առնվազն միացման 2 տեղեր, որոնց հետ լիգանդը կարող է կապվել: Կոոպերատիվ փոխազդեցությունների դեպքում փոխազդող մոլեկուլի կոնցենտրացիայի փոքր փոփոխությունն առաջացնում է մեծ էֆեկտներ, մինչդեռ ոչ կոոպերատիվ փոխազդեցության դեպքում անհրաժեշտ է լիգանդի կոնցենտրացիայի մեծ փոփոխություն [7,9,10]:

O_2 -ի կապումը հեմոգլոբինի (Hb) հետ կոչվում է հոմոտրոպ փոխազդեցություն, ընդ որում, տվյալ մոլեկուլի միացումն ազդում է մյուսների միացման ընդունակության վրա: Կապման տեղերը կարող են խիստ փոփոխվել, եթե փոխվի կապվող մոլեկուլի կոնցենտրացիան կամ ավելացվի մի այլ մոլեկուլ, այսինքն, եթե առաջ անահետերոտրոպ փոխազդեցություն:

Չե տերոտրոպ փոխազդեցության օրինակ է O_2 -ի և CO_2 -ի փոխազդեցությունը Hb-ի հետ: Hb-ի հետ O_2 -ի միացման կորը, պահպանելով իր տեսքը, շեղվում է դեպի աջ, երբ CO_2 -ի պարօցիալ ճնշումը մեծանում է, քանի որ այդ դեպքում նվազում է O_2 -ի խնամակցությունը Hb-ի նկատմամբ:



Նկար 2. Մակրոմոլ եկոլի հետլիզանդի կապման կորը մեկ տեղի դեպքում [7]:

Սաշատկարևոր կենսաբանական նշանակություն ունի, քանի որ այն հեշտացնում է O_2 -ի և CO_2 -ի փոխանակությունը օրգանիզմում: Հետերոտրոպ էֆեկտը տարբերվում է լիգանդների միջև մրցակցությունից, որն առաջանում է, երբ նրանք նույն տեղին են կապվում: Օրինակ՝ Hb-ի հեմի հետ O_2 և CO_2 կապվելիս առաջանում է մրցակցություն, մինչդեռ հետերոտրոպ փոխազդեցության դեպքում լիգանդները մակրոմոլեկուլի տարբեր հատվածների հետ են փոխազդում: Սակայն այդ դեպքում ևս մի լիգանդի միացումը տվյալ հատվածին ազդում է մեկ այլ հատվածի հետմյուսի միացման վրա [7-10]: Կոոպերատիվ փոխազդեցության վերլուծության համար հարմար մեթոդ է Հիլի մեթոդը: Այն առաջարկվել է Hb-ի հետ O_2 -ի կապման համար, երբ ենթադրվում էր, որ Hb-ը կազմված է մեկ մոնոմերից: Հիլը ենթադրեց, որ ստացվող սիգմայաձև կորը հնարավոր է բացատրել՝ հիմք ընդունելով միացման միայն մեկ տեղի առկայությունը: Ուստի նա ենթադրեց, որ մոնոմերները կարող են դարձել իրենց միավորվել իրար հետ՝ առաջացնելով ագրեգատներ, որի հետևանքով միացման տեղերի միջև առաջանում են փոխազդեցություններ: Հետագայում ցույց տրվեց, որ Hb-ը տետրամեր է: Hb-ի հետ լիգանդի կոոպերատիվ փոխազդեցությունը Հիլը ներկայացրել է առանց միջանկյալ ձևերի $E + nL \rightarrow EL_n$, որի դեպքում՝

$$K = \frac{[EL_n]}{[E][L]^n}$$

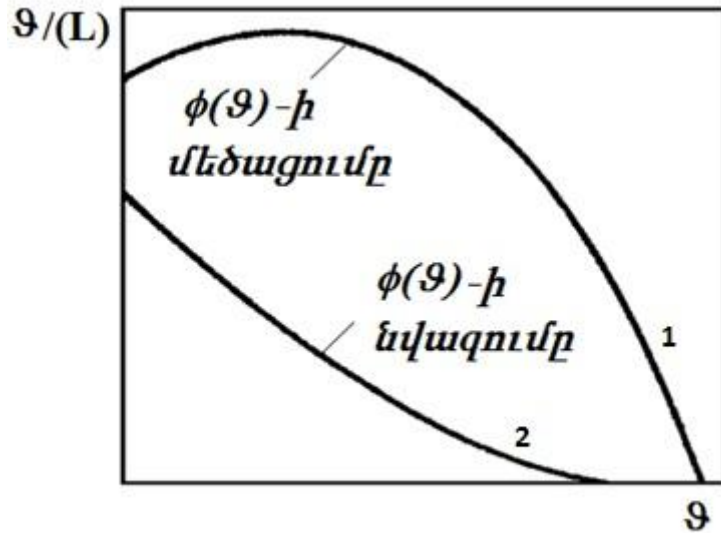
Եթե մակրոմոլեկուլի լրիվ կոնցենտրացիան $[E]_0$ է, ապա լոգարիթմելով՝ կստանանք.

$$\lg K + n \lg [L] = \lg \left(\frac{[EL_n]}{[E]_0 - [EL_n]} \right)$$

Եթե Հիլի հաստատունը նշանակենք n_H և $y = \frac{[EL_n]}{[E]_0}$, ապա

$$\lg K + n_H \lg [L] = \lg \left(\frac{y}{1-y} \right)$$

Այս արտահայտությունը կարելի է որոշել և իզանդի կապված մոլեկուլների թիվը՝ y -ը որպես $[L]$ -ից կախված ֆունկցիա՝ Յիլի հաստատուն՝ n_H -ի միջոցով [7,9,10].



Նկար 3. Սկեռչարդի կորերը կոոպերատիվ (1) և հակակոոպերատիվ (2) փոխազդեցությունների դեպքում [7]:

$$n_H = \frac{d \ln \left(\frac{y}{1-y} \right)}{d(\ln[L])} = \frac{1}{y(1-y)} \frac{dy}{d(\ln[L])} \quad (9)$$

Եթե միացման բոլոր տեղերը լինեին համարժեք և անկախ, ապա արդյունաբերար կորը իրենից կներկայացներ ուղիղ գիծ՝ $n_H=1$: Hb-ի դեպքում, որին բնորոշ է կոոպերատիվ փոխազդեցություն միացման տեղերի միջև, n_H -ը ընդհանուր առմամբ հաստատուն է y -ի որոշակի միջակայքում՝ 0,3-ից 0,7: Այդ միջակայքում տվյալները կարելի է ներկայացնել մեկ հաստատունով հավասարումով՝

$$y = \frac{K[L]^{n_H}}{1 + K[L]^{n_H}} \quad \text{կամ} \quad \frac{y}{1-y} = K[L]^{n_H} \quad (10)$$

Սա իրենից ներկայացնում է Յիլի հավասարումը [6,8,9]: Եթե Hb-ը 4 մոլեկուլ O_2 միանգամից կապեր իրեն, այսինքն լինեին 2 վիճակներ՝ Hb ($\bar{g}=0$) և Hb (O_2)₄ ($\bar{g}=4$), ապա կապման կորը կհամապատասխաներ $n_H=4$ դեպքին, այսինքն n_H -ը համարժեք է կապման բոլոր տեղերին՝ n -ին: Իրականում սակայն, նման երևույթ հնարավոր է, քանի որ միշտ առկա են միջանկյալ ձևեր՝ $\bar{g}=0$ և $\bar{g}=4$ միջակայքում [10]: Չնայած դրան, այդպիսի վիճակները չնչին քանակով են այնպիսի համակարգերում, ինչպիսին Hb(O_2)₄-ն է՝ $\bar{g} = 2$ դեպքում: Նորմալ հեմոգլոբինի համար կատարված հետազոտություններում n_H -ի արժեքը $\bar{g} = 2$ դեպքում ընկած է 2,5-3,3 միջակայքում, այսինքն կոոպերատիվության աստիճանը մեծ է: Hb-ի որոշ մոլեցիաների դեպքում n_H -ի արժեքը էականորեն փոքր է, օրինակ հեմոգլոբինի H մուտանտ ձևը կազմված է 4β շղթաներից, որի համար $n_H=1$: Չակակոոպերատիվ համակարգերում n_H -ը փոքր է 1-ից:

Կոոպերատիվ համակարգերում ծայրակետային արժեքներում՝ $\bar{g}=0$ և $\bar{g}=4$, n_H -ը ձգտում է 1-ի, այսինքն $\bar{g}=0$ կետում, երբ [L]-ը գրեթե 0 է, մակրոմոլեկուլը մեծ կոնցենտրացիայով է և այդ դեպքում ըստ գործող զանգվածների օրենքի՝ հաստատվում է մեկ տիպի հավասարակշռություն: Նման ձևով, երբ $\bar{g} \approx n$, ապա Hb-ը գտնվում է Hb(O_2)₃ և Hb(O_2)₄ վիճակներում և նորից հավասարակշռությունը հաստատվում է նույն օրենքով [7-10]: Յիլի և Սկետչարդի

գրաֆիկների միջև կապը արտահայտվում է նրանով, որ կոռպերատիվ համակարգերի համար Սկետչ արդի կորը ունի դրական թեքություն [L]-ի ցածր արժեքների դեպքում: Երբ [L]-ը մեծանում է, ապա այդ կորը անցնում է մաքսիմումով և [L]-ի հետագա մեծացմանը զուգընթաց ձգտում է 0-ի: Hb-O₂ կոմպլեքսի համար ստացվող կորն ունի լայն մաքսիմում՝ y=0,68-0,72: Յիլի և Սկետչ արդի պարամետրերի միջև կապն արտահայտվում է հետևյալ հավասարումով.

$$\frac{d\left(\frac{y}{[L]}\right)}{dy} = \frac{1}{[L]}\left(1 - \frac{y}{[L]}\frac{d[L]}{dy}\right) = \frac{1}{[L]}\left(1 - \frac{d(\ln[L])}{d(\ln y)}\right) \quad (11)$$

իսկ Յիլի կորի թեքությունը որոշվում է.

$$\frac{d \ln\left(\frac{y}{1-y}\right)}{d \ln[L]} = \frac{[L]}{y} \left[\frac{1}{1-y} \right] \frac{dy}{d[L]} = \frac{1}{1-y} \left(\frac{d(\ln y)}{d(\ln[L])} \right) \quad (12)$$

Կապման կորի մաքսիմումը Սկետչ արդի կոորդինատներով որոշվում է ըստ.

$$\frac{d(\ln y)}{d \ln[L]} = 1$$

$y = y_{\max}$ կետում: Յիլի գրաֆիկի թեքությունը y_{\max} -ի շուրջը որոշվում է հետևյալ արտահայտությամբ.

$$n_H = (1 - y_{\max})^{-1}$$

Այնուամենայնիվ պետք է նշել, որ կոռպերատիվ փոխազդեցությունների դեպքում Սկետչ արդի մեթոդով վերլուծությունը քիչ հուսալի է [9-13]:

1.2. Ինտերկալյատորների փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ

ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման ինտերկալյացիոն եղանակը հետաքրքրություն է ներկայացնում այն տեսանկյունից, որ թույլ է տալիս բացատրել ու հարթ, արոմատիկ օղակների խումբ պարունակող միացությունների կենսաբանական ակտիվությունը [14]: Ի տարբերություն ոչ ինտերկալյացիոն եղանակով կապվող լիգանդների [15-17], ինտերկալյատորները, ներդրվելով ԴՆԹ-ի մոլեկուլի մեջ, հրահրում են տեղային վերակառուցումներ, ինչի

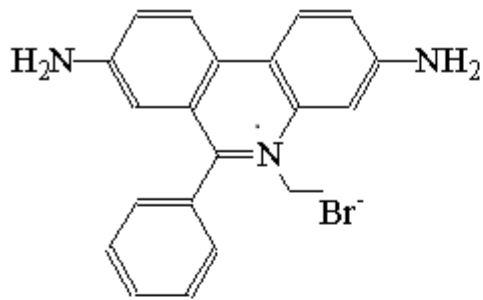
արդյունքում ԴՆԹ-ի մոլեկուլի կառուցվածքը էապես փոփոխվում է: Այս փոփոխությունները պետք է փոխհատուցվեն ազատ էներգիայի փոփոխությամբ: Ինտերկալյատորներին (նկար 4) հատուկ է հարաբերականորեն փոքր խնամակցություն ԴՆԹ-ի նկատմամբ և չնայած դրանցից շատերի համար հաշվարկվել են կապման հաստատությունները, սակայն ստանդարտ ΔH^0 -ի (էնթալպիայի փոփոխության) և ΔS^0 -ի (էնթալպիայի փոփոխության) համար հավաստի տվյալները փոքրաթիվ են [19-25]:

Քանակական ճշգրիտ տվյալների սակավությունը թույլ չի տալիս կապել կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների ընտրությունը (սկրինինգը) տվյալ կոմպլեքսի առաջացման ջերմադինամիկ հավանականության հետ: Փորձ է կատարվել ճշգրտորեն որոշել կապման ազատ էներգիայի՝ ΔG^0 -ի արժեքը ԷԲ-ի և պրոպիդիոլմի յոդիդի (ՊՅ) համար: Այսպիսի վերլուծությունը ցույց է տվել, որ դասական ինտերկալյատորների միացումը ԴՆԹ-ի հետ հանգեցնում է կապման հատվածում միանման հիդրոֆոբ և Վան-դեր-Վաալսյան էֆեկտների [26,27]: Օրինակ՝ անտրացիկլինային հակաբիոտիկ նոգալամիցինը (նկար 4) ընտրողաբար կապվում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսի շաքարաֆոսֆատային կմախքի ԿրԳ հաջորդականության հետ:

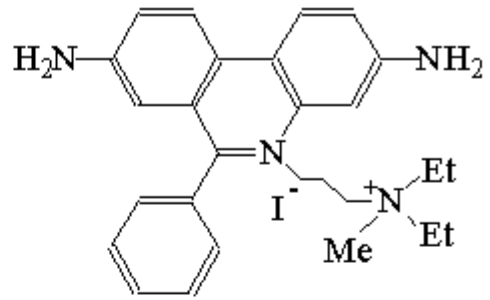
ԴՆԹ-նոգալամիցին կոմպլեքսի կառուցվածքը որոշվել է ռենտգենակառուցվածքային վերլուծության (ՌԿՎ) և միջուկային մագնիսական ռեզոնանսի (ՄՄՌ) մեթոդներով: Ինտերկալյացիայի արդյունքում գրանցվում է ^1H և ^{31}P ատոմների ՄՄՌ-ի արժեքների մեծ փոփոխություն: Ընդ որում, ԿրԳ հաջորդականության դեպքում ՄՄՌ սպեկտրների մեծ շեղումը (1 p.p.m.) դեպի թույլ դաշտերը վկայում է $\text{B}_1\text{-B}_2$ անցման մասին [28]: Դա հանգեցնում է ԴՆԹ-ի ապապորումանը, քանի որ ինտերկալյացիայի համար անհրաժեշտ է, որ հիմքերի երկու գոլյգերը ԴՆԹ-ի երկայնքով հեռանան միմյանցից: Ընդ որում, տորսիոն անկյունների այլ պարամետրերը նույնպես փոխվում են, հնարավոր դարձնելով ինտերկալյատորի ներդրումը հիմքերի երկու գոլյգերի միջև: Նոգալամիցինը ներդրում է $d(\text{ATGCAT})$ - $d(\text{TACGTA})$ հաջորդականությամբ պլինուկլեոտիդի TpG/ApC հատվածում: Ընդ որում, թիմինի շաքարային օղակը գտնվում է C_3' -էնդո կոնֆորմացիոն վիճակում, մինչդեռ մյուս շաքարային

Խմբերը գլխավորապես մտնում են C_2 -էնդոկոնֆորմացիան վիճակում: CpA երկնուկը եռտիդային հատվածը փոխարկվում է B_2 կոնֆորմացիայի՝ կրելով բոլոր համապատասխան փոփոխությունները այն պարամետրերում, որոնք բնութագրական են այդ ձևի համար: Մյուս մնացորդներում տեղային փոփոխությունները նվազագույն են:

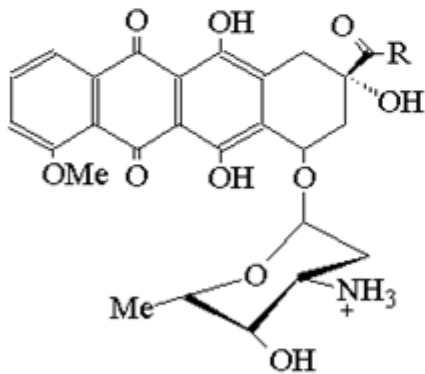
Լիգանդի ինտերկալյացիայի համար հարկավոր է, որպեսզի B - γ - δ -ի մոլեկուլը պարուրվի մոտ 20° -ով, 36° -ի փոխարեն, իսկ պարուրի հետ ոլորման (ռայզինգի)



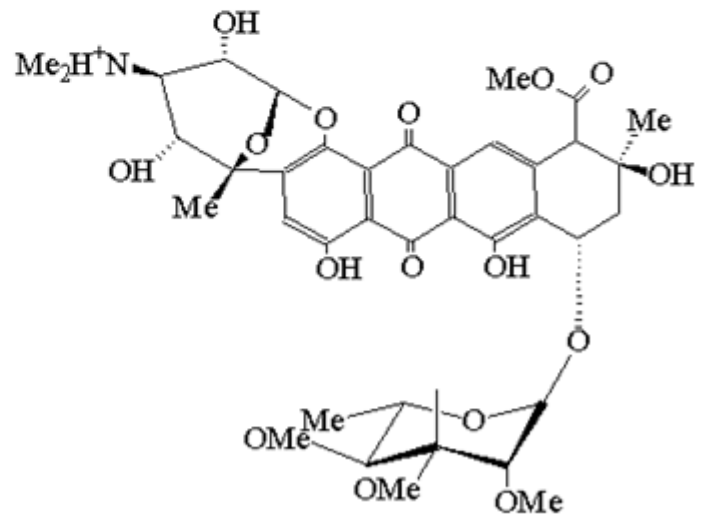
Էթիդիումի բրոմիդ



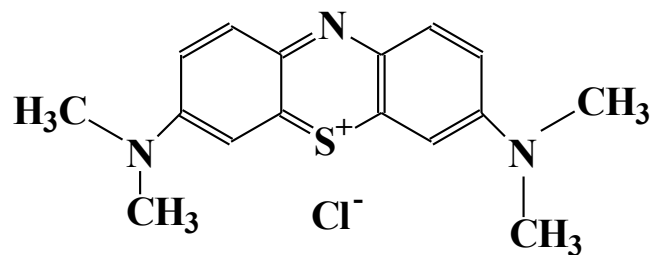
Պրոպիդիումի յոդիդ



**Րաուևումիցին (R=H)
Ադրիամիցին (R=OH)**



Լոզալամիցին



Մեթիլեն Կապուլտ

Նկար 4. ԴՆԹ-ի հիմքերի գույգերի հարթության մեջ ներդրվող քրոմոֆորային խմբեր պարունակող որոշ ինտերկալյա ստորնների կառուցվածքը [18]:

արժեքը պետք է լինի 7Å, որպեսզի հիմքերի զույգերը տեղաշարժվեն 3.4 Å-ով և հնարավոր դարձնեն լիզանդի ներդրումը: Ընդ որում, զույգ հիմքերի պարուրային կառուցվածքի այլ պարամետրերը նույնպես փոփոխություն են կրում, և նույնիսկ մոլեկուլային դինամիկայի (ՄԴ) մեթոդով սահմանափակ մոդելավորման դեպքում այս պարամետրերը էականորեն տարբեր են հարաբերական միջին արժեքներից:

Այսպիսով, ինտերկալյացիան ԴՆԹ-ի կառուցվածքում հանգեցնում է էական փոփոխությունների և պրոտեոցիալ էներգիայի աճի: Ինտերկալյացիայի ժամանակ տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի պարուրյի առանցքների տեղաշարժ և ստեկինգ փոխազդեցությունների խախտում: Այնուամենայնիվ, հիմքերի զույգերի միջև ստեկինգի խախտումը փոխատուցվում է դրանց և լիզանդի արոմատիկ օղակների միջև Վան-դեր-Վաալսյան և էլեկտրաստատիկ նոր փոխազդեցությունների առաջացմամբ: Չնայած ինտերկալյացիայի ժամանակ տեղի ունեցող տեղային կառուցվածքային փոփոխություններին, ԴՆԹ-ի մոլեկուլը շարունակում է պահպանել B կոնֆիգուրացիան, քանի որ այս էֆեկտները չեն տարածվում պարուրյի ողջ երկարությամբ: Այդ մասին են վկայում աշխատանք [29]-ում ստացված տվյալները, որտեղ գնահատված է շաքարաֆոսֆատային կմախքի շարժունակությունը և ցույց է տրված, որ մեծ փոփոխությունները արագորեն մարում են՝ շնորհիվ ԴՆԹ-ի մոլեկուլի ազատություն մեծ աստիճանի:

1.2.1. ԷԲ-ի փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ

ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների ուսումնասիրությունը օպտիկական պտույտի դիսպերսիայի (ՕՊԴ), շրջանային դիքրոիզմի (ԾԴ), հավասարակշռական դիախրոիզի և ջերմային բնափոխման մեթոդներով, ցույց է տվել, որ այդ լիզանդը կապվում է ԴՆԹ-ի հետ առնվազն երկու եղանակներով (տես [30]): Կապման եղանակներից մեկը հանդիսանում է ուժեղ, մյուսը կամ մյուսները՝ թույլ: Ուժեղ եղանակով կապմանը համապատասխանում են $r=0.1-0.2$ ($r=$ լիզանդ/ԴՆԹ, ըստ մեկ նուկլեոտիդի), թույլ եղանակին՝ $r=1.0$

արժեքներ: ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման երկու և ավելի եղանակների առկայության մասին վկայում են ֆոտոմետրիկ արդյունքների հիման վրա քանակական վերլուծության արդյունքում Սկետչարդի մեթոդով ստացված կորերը, որոնք ուղղագիծ չեն: Գծային կորեր ստացվում են, երբ ԴՆԹ-ի հետ փոքր մոլեկուլների փոխազդեցության դեպքում առկա է կապման միայն մեկ եղանակ: Ուժեղ և թույլ սահմանումները պայմանավորված են նրանով, որ բազմաթիվ հետազոտությունների արդյունքում ցույց է տրվել, որ, հատկապես ԷԲ-ի դեպքում, կապման առաջին եղանակը գրեթե կախված չէ լուծույթի իոնական ուժից, մինչդեռ թույլ եղանակով կապումը մեծապես կախված է այդ գործոնից և ենթադրվում է, որ այդ դեպքում ներկանյութը փոխազդում է ԴՆԹ-ի հետ էլեկտրաստատիկ մեխանիզմով, առաջացնելով սյունակներ՝ ԴՆԹ-ի պարույրի արտաքին կողմում: Կապման ուժեղ եղանակի դեպքում ներկանյութի քրոմոֆորային խումբը ներդրվում է (ինտերկալյացիա) հիմքերի զույգերի հարթության մեջ, ուստի այդ պրոցեսը կախված չէ լուծույթի իոնական ուժից, քանի որ այսպիսի փոխազդեցությունն իրականանում է անգամ 7M CsCl լուծույթում և վառ արտահայտված սպեցիֆիկությունն ԴՆԹ-ի որոշակի նուկլեոտիդների նկատմամբ չի դրսևորվում (տես [29]): ԷԲ-ը կոմպլեքսներ է առաջացնում նաև միաշղթա պլինուկլեոտիդների, մասնավորապես, ՌՆԹ-ի և դենատուրացված կամ բնական միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ: Այնուամենայնիվ, ենթադրվում է, որ այդ պլինուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ը ուժեղ եղանակով կապվում է, եթե դրանցում առկա են երկշղթա տեղամասեր [31]:

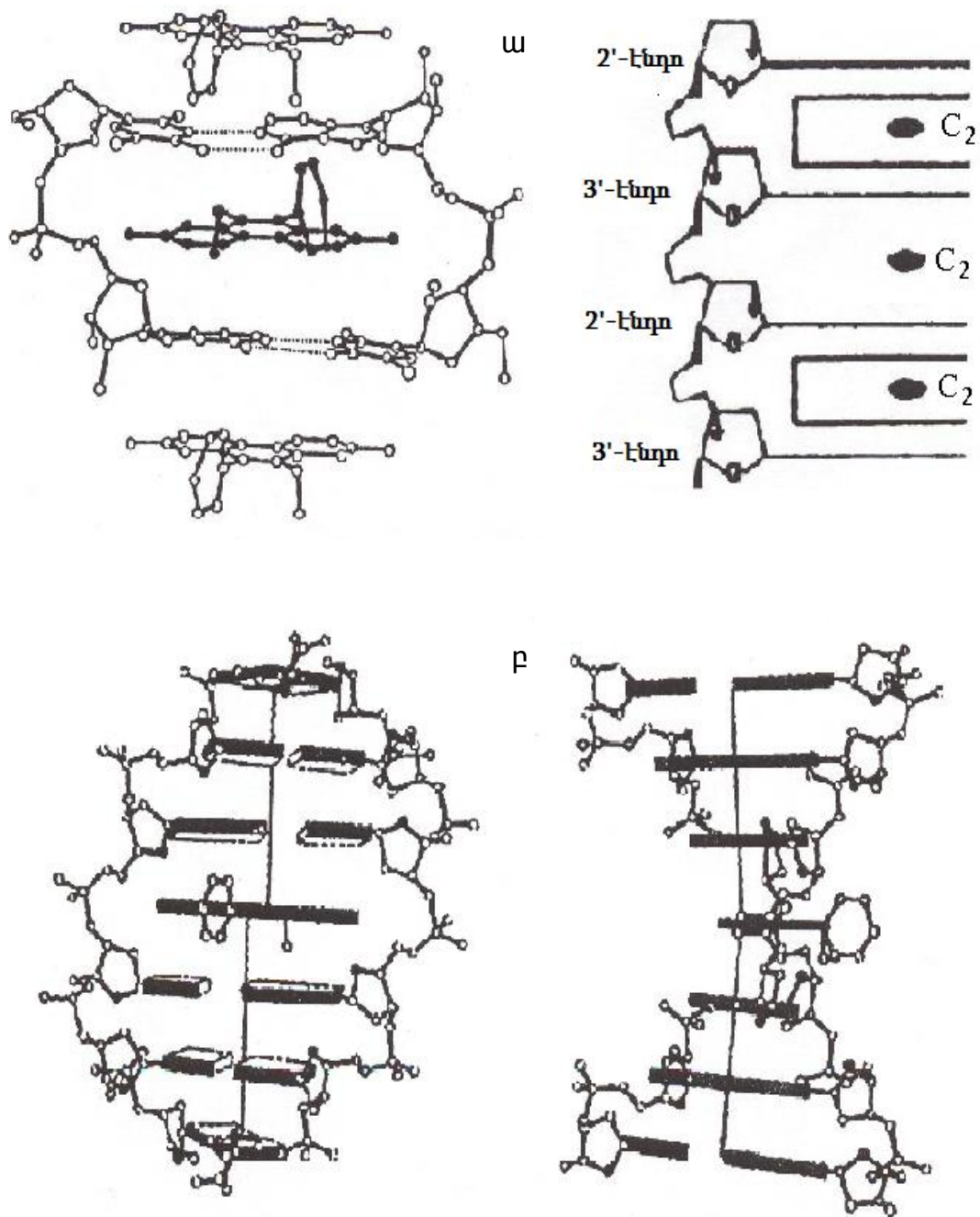
Մեծ թվով փորձարարական տվյալներ ցույց են տալիս, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է ոչ կոոպերատիվորեն: Սկետչարդի կոորդինատներով կապման կորերը վկայում են, որ այդ լիգանդի առավելագույն հագեցման դեպքում $r=0.5$, որը համապատասխանում է իրար հաջորդող կապված և ազատ տեղերին: Սակայն վում է կապման բացառված տեղերով մոդել, որի դեպքում կապման կորերը ոչ գծային են: Սինթետիկ պլինուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության ժամանակ նուկլեոտիդների տիպի նկատմամբ վառ արտահայտված սպեցիֆիկությունն չի հայտնաբերվում: Հիդրոֆոբիկ մեթոդներով ևս ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի

փոխազդեցության հիմնական մեխանիզմը ինտերկալյացիան է: Ընդ որում, փոխազդեցության արդյունքում լիգանդի արոմատիկ օղակների հարթությանը մնում է ուղղահայաց պարույրի առանցքի նկատմամբ, ինչը կարելի է հայտնաբերել գծային դիֆրոիզմի (ԳԴ) մեթոդով [31]: Այդ մասին վկայում են նաև օլիգոնուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների բյուրեղների ՌԿՎ և ՄՄՌ մեթոդներով հետազոտության արդյունքները (նկար 5 ա) [3,30]: B-ԴՆԹ-ում շաքարի օղակը գտնվում է C₂'-Էնդո կոնֆորմացիայում, իսկ A-ԴՆԹ-ում՝ C₃'-Էնդո: ԷԲ-ի հետ կոմպլեքսում 5-յոդ-ՍրA դինուկլեոտիդի շաքարը, որը կապված է 3' ատոմի միջոցով, գտնվում է C3'-Էնդո կոնֆորմացիայում և C₂-Էնդո կոնֆորմացիայում, եթե նուկլեոտիդը ՍրA դիմերում կապված է 5' ատոմի միջոցով: Այսպիսով, կոմպլեքսի կառուցվածքը իրենից ներկայացնում է 2'-Էնդո-յոդ-Սր-3'-Էնդո-A հաջորդականություն և, քանի որ կոմպլեքսի առաջացմանը մասնակցել է դինուկլեոտիդ, ապա ծայրային էֆեկտները չի կարելի հաշվի չառնել:

Պոլիմերի դեպքում առկա են շաքարի 2'-Էնդո և 3'-Էնդո կոնֆորմացիաների հաջորդականություններ շղթաներից յուրաքանչյուրում, ինչի արդյունքում հիմքերի զույգերի հարթության առանցքի սիմետրիան խախտվում է: Այդ դեպքում, C₂-ի սիմետրիայի առանցքը, որը տեղակայված է հարևան հիմքերի միջև, պահպանվում է և անցնում ԷԲ-ի ինտերկալացված մոլեկուլի կենտրոնով [7,32]: ԷԲ-ի կապման տեղին անմիջականորեն հարևան ստորին և վերին տեղամասերը կարող են ունենալ C₂' տեղային սիմետրիա, սակայն այս դեպքում դրանք կտարբերվեն կառուցվածքներով, քանի որ շաքարի մոլեկուլների՝ միմյանց նկատմամբ դասավորվածությունը կլինի հակադարձ: Եթե դինուկլեոտիդի դեպքը արտարկենք (էքստրապոլյացիա) պոլիմերի համար, ապա ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրը ձեռք է բերում այնպիսի կոնֆորմացիա, որում հաջորդական հատվածներում հարևան հիմքերը տարբեր կառուցվածքներ են ունենում: Եթե այս կառուցվածքներում տեղի ունենա ինտերկալյացիա, ապա հարևան հատվածներում ինտերկալյացիան դառնում է Էներգետիկորեն ոչ ձեռնտու և կապման այս տեղերը դառնում են բացառված (նկար 5 բ) [7]: B-ԴՆԹ-ի դեպքում ինտերկալյացիայի իրականացման համար

անհրաժեշտ է, որպեսզի կապման տեղի հարևանությամբ շաքարը C₂-
Էնդո վիճակից փոխարկվի C₃-Էնդովիճակի, A-ԴՆԹ-ի դեպքում,
ընդհակառակը: B-ԴՆԹ-ում ինտերկալյացիայի դեպքում տեղում է
ունենում պարույրի առանցքի բեկում 8°-ով, եթե պարույրը
տարածվում է ինտերկալյացիոն տեղամասի նկատմամբ երկու
ուղղություներով:

ՄՄԲ սպեկտրասկոպիայի մեթոդով ցույց է տրվել, որ
լուծույթներում նույնպես ԷԲ-ի հետ կոմպլեքսագոյացման
դեպքում արլ ինուկլեոտիդի շաքարը C₂-Էնդո վիճակից



Նկար 5. ԴՆԹ-ի մոլեկուլում ԷԲ-ի ինտերկալյացիայի մոդելը (ա): Լիգանդի մոլեկուլով հագեցած երկշղթա ԴՆԹ-ի կառուցվածքային մոդելը (բ): Ինտերկալյացիայի դեպքում տեղի է ունեցել ԴՆԹ-ի առանցքի բեկում և տեղաշարժ [7]:

C₃-էնդո ձևափոխության է ենթարկվում: Ցույց է տրված նաև, որ ԷԲ-ի մոլեկուլները ընտրողաբար կապվում են պիրիմիդին-3',5'-պուրին երկշղթա հաջորդականությունների հետ: Մյուս կողմից՝

ոչ կոմպլեմենտար դինուկլեոզիդֆոսֆատների հետ կոմպլեքսագոյացում չի նկատվում [32]:

Այս տեսանկյունից, ըստ ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի վրա լիզանդների ազդեցության, դրանք կարելի է բաժանել երկու խմբի՝ կայունացնող (ամրակներ) և ապակայունացնող (հակամրակներ): ԴՆԹ-ի ազատ լիզանդի հետ կապված մոլեկուլների հալման կորերի համեմատումը կարող է տեղեկություն տալ լիզանդի կապման բնույթի մասին:

Եթե կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանը (T_m) ավելի մեծ է, քան ազատ ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը՝ T_0 -ն, ապա տեղի է ունենում կայունացում, իսկ եթե T_m -ի արժեքը նվազում է, ապա ԴՆԹ-ի մոլեկուլը ապակայունանում է այդ փոխազդեցության արդյունքում: Եթե լիզանդը օժտված է մեծ ինամակցությամբ երկպարույր արլինուկլեոտիդի նկատմամբ, ապա այն կկայունացնի նատիվ կառուցվածքը, իսկ այն մոլեկուլները, որոնք ավելի լավ են կապվում կծիկային ԴՆԹ-ի հետ՝ ապակայունացնում են այն: Հալման միջակայքի լայնությունը երկու դեպքում էլ աճում է: Երկու համարժեք վիճակագրական մեթոդների միջոցով մշակվել է ԴՆԹ-ի հետ ամրակների կոմպլեքսներում պարույր-կծիկ անցման տեսություն:

Այդ տեսության ենթադրություններից մեկը այն է, որ հալման միջակայքի լայնության փոփոխության՝ $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի ($\delta(\Delta T/T_m^2) = \delta(\Delta T/T_m^2) - \delta(\Delta_0 T/T_0^2)$), որտեղ ΔT -ն և ΔT_0 -ն համապատասխանաբար ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների և ազատ ԴՆԹ-ի հալման միջակայքի լայնություններն են, T_m -ը և T_0 -ն՝ հալման ջերմաստիճանները) կախվածությունը լիզանդի կոնցենտրացիայից ունի զանգակաձև տեսք: Դա բացատրվում է նրանով, որ լիզանդի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ΔT -ն աճում է, քանի որ ամրակների դեպքում տեղի է ունենում լիզանդի կապված մոլեկուլների վերաբաշխում և դրանք ԴՆԹ-ի դենատուրացված տեղամասերից արկվելով՝ կապվում են դեռևս չդենատուրացված տեղամասերի հետ (և հակառակը՝ հակամրակների դեպքում): Վերաբաշխման արդյունքում ԴՆԹ-ի դեռևս չդենատուրացված տեղամասերը լրացուցիչ կայունություն են ձեռք բերում դենատուրացման գործոնի նկատմամբ, ուստի հալման պրոցեսը երկարաձգվում է:

Երկշղթա ԴՆԹ-ում առկա կապման տեղերի սահմանափակ լինելու հետևանքով լիզանդի կոնցենտրացիայի մեծացումը դժվարեցնում է վերաբաշխման պրոցեսը: Երբ կապման բոլոր տեղերը հագեցնում են ամրակի մոլեկուլներով, հալման միջակայքի լայնությունը դադարում է փոփոխվել:

Քննարկվող դեպքում ենթադրվում է, որ պոլիմերում հիմքերի յուրաքանչյուր զույգ կարող է հանդիսանալ լիզանդի կապման տեղամաս: Հիմնվելով այդ դրույթի վրա, մշակվել է տեսություն, որի միջոցով ստացված տվյալները համեմատվել են կոմպլեքսների հալման փորձարարական արդյունքների հետ, երբ որպես ամրակներ օգտագործվել են ակրիդինային գուլանային թակտինոմիցինը, նատիվ (ապակայունացնող) և դենատուրացված (կայունացնող) ՌՆԹ-ազ, ծանր մետաղների՝ Ag, Cu իոնները: Նշված աշխատանքներում ստացված տվյալները հաստատել են տեսության այն ենթադրությունը, որ ամրակների կոնցենտրացիայից կախված, հալման միջակայքի լայնության փոփոխությունն ունի զանգակածև տեսք, իսկ կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման ջերմաստիճանը մոնոտոն աճել է կամ ընդհակառակը՝ նվազել է:

Սակայն, երբ ստացված տեսական մոդելի միջոցով հաշվարկվել է ԴՆԹ-ներկանային կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման ջերմությունը, պարզվել է, որ այս մեծությունը 2-3 անգամ փոքր է այլ լիզանդների (ՌՆԹազ, ծանր մետաղների իոններ) համար ստացված համապատասխան մեծությունից: Բազմաթիվ փորձերը՝ ուղղված այս անհամապատասխանության պատճառի պարզաբանմանը, հաջողությամբ չեն պսակվել:

Մյուս կողմից, ցույց է տրվել, որ հալման ջերմաստիճանի փոփոխության՝ $\delta(1/T_m)$ -ի ($\delta(1/T_m)=1/T_0-1/T_m$) և $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի տեսականորեն ստացված արժեքները քանակապես տարբերվում են փորձարարական եղանակով ստացված մեծություններից, հատկապես երբ որպես լիզանդ է Ag-ը: Այս երևույթը բացատրելու համար ենթադրվել է, որ մշակված տեսության մեջ հաշվի չի առնվել ամրակի մոլեկուլների (մետաղի իոնների) միջև փոխազդեցությունը:

Այնուամենայնիվ, ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման միջակայքի լայնության փոփոխության կորի աճի արտարկումը գրոյի՝ ամրակի կոնցենտրացիայի մեծ արժեքների

կողմից, տալիս է այնպիսի արդյունքներ, որոնք համապատասխանում են գրականության մեջ նշված կապման առավելագույն տեղերի քանակին: Սա համապատասխանության մեջ է գտնվում այն տեսության հետ, որում հաշվի չի առնվում ամրակների միջև փոխազդեցությունը և այս պատճառով գրանցվող տարբերության նմանատիպ մեկնաբանությունը բավականաչափ հիմնավորված չէ:

Բազմաթիվ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ լիգանդները կարող են ընտրողաբար կապվել նատիվ ԴՆԹ-ի միայն որոշակի հատվածների հետ (տես [33-35]): Այդ պատճառով պոլիմերում առկա կապման տեղերը շատավելի քիչ են, քան դրանում առկա գույգ հիմքերը: Ընդ որում, կծիկանման հատվածների հետ փոխազդեցությունը կարող է մնալ ոչ սպեցիֆիկ և կապման տեղերի առկայությունը հավանաբար ԴՆԹ-ի վրա կարող է լինել ավելի շատ, քան պարուրային ԴՆԹ-ում:

Նմանատիպ հատկություններ ունենալու մետաղի իոնները, ընդ որում նույն մետաղը՝ կախված վալենտականությունից, կոնցենտրացիայից և լուծույթի իոնական ուժից, կարող է հանդես գալ ինչպես ԴՆԹ-ի պարուրային կառուցվածքի կայունացնող, այնպես էլ ապակայունացնող լիգանդ [36]: Դրա հիման վրա ենթադրություն է արվել, որ տեսության և փորձի միջև գրանցվող նման տարբերությունը կապված է այն բանի հետ, որ տեսությունում հաշվի չի առնվում ԴՆԹ-ի հետ ամրակների կապման մի քանի եղանակների հնարավորությունը:

Եթե կառուցվի ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կոմպլեքսների համալիր միջակայքի լայնության փոփոխության կախվածությունը ամրակի կոնցենտրացիայից և որոշվի ցածրամոլեկուլային միացության կոնցենտրացիայի նվազագույն արժեքը, որի դեպքում պարուրային կծիկանցման լայնության փոփոխությունը համընկնում է ազատ ԴՆԹ-ի համար ստացված ΔT_0 արժեքի հետ, ապա կարելի է որոշել կապման առավելագույն տեղերի թիվը:

Կատարված փորձերը տվել են լավ արդյունքներ ԷԲ և ակտինոմիցին Դ-ի (ԱՄԴ) համար, որոնք համընկնում են գրական տվյալների հետ: Պարզվել է, որ այս լիգանդների դեպքում մեկ մոլեկուլի կապման համար անհրաժեշտ է երկու գույգ հիմք: Սակայն այս լիգանդների մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում փորձերի

արդյունքները էականորեն տարբերվում են տեսականորեն կանխատեսվող արդյունքներից:

Մասնավորապես, տարբերվում է հալման միջակայքի լայնության աճի կախվածությունը պոլիմերին կապված ամրակների կոնցենտրացիայից: Կատարված վերլուծությունը թույլ է տվել պարզել այս անհամապատասխանության պատճառը և բացատրել նախկինում այլ լիգանդների (ծանր մետաղների իոններ, ՌՆԹազներ) դեպքում ΔH -ի համար, ինչպես նաև միկրոկալորիմետրիկ մեթոդների միջոցով ստացված տվյալների միջև մեծ տարբերությունը (տես [37]): Պարզվել է, որ E° -ը, ԱՄԴ-ն, որոշ ծանր մետաղների իոններ ԴՆԹ-ի հետ կապվում են մի քանի եղանակներով (բազմաբևույթ լիգանդներ), ընդ որում այս լիգանդների բազմաբևույթ փոխազդեցությունը հայտնաբերվում է ինչպես երկշղթա, այնպես էլ միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ [38]:

1.3. ԴՆԹ-ի ոչ կանոնիկ կառուցվածքները

Ներկայումս էլ դեռ գիտական հանրության համար ԴՆԹ-ն շարունակում է մնալ դեռևս լիովին չպարզաբանված կենսաբանական համակարգերից մեկը: Դալիովին հաստատվում է այն փաստով, որ թեև 1868 թ. Ֆ. Միշերը ԴՆԹ-ն անջատել էր որպես բջջի բաղադրամաս, սակայն դրա կառուցվածքը և կենսաբանական նշանակությունը գիտությունը կարողացել է պարզաբանել միայն 20-րդ դարի 40-50-ական թվականներին [32,39]:

Սկզբնական շրջանում ընդունված էր այն տեսակետը, որ ԴՆԹ-ն բջիջներում պահեստավորում է ֆոսֆորը: Ընդհուպ մինչև 20-րդ դարի սկիզբը համարվում էր, որ ԴՆԹ-ն ոչ մի կապչուն ժառանգական տեղեկատվության փոխանցման հետ, քանի որ ունի միօրինակ կառուցվածք և չի կարող իր մեջ գաղտնագրված տեղեկատվություն պարունակել:

Սակայն այդ պատկերացումներն աստիճանաբար սկսեցին փոփոխվել և արդեն 1944 թ.-ին վերջնականապես ապացուցվեց այն փաստը, որ հենց ԴՆԹ-ն է ժառանգական տեղեկատվության պահպանողը և հաջորդ սերունդներին փոխանցողը:

Հետագայում կուտակված փորձարարական տվյալների վերլուծության արդյունքում Ֆրենսիս Կրիկը և Ջեյմս Ուոթսոնը 1953թ. առաջարկեցին ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի մոդելը, որի համար հետագայում արժանացան Նոբելյան մրցանակի [32,39]: Ըստ այդ մոդելի՝ ԴՆԹ-ն երկու պարույրներից կազմված մոլեկուլ է, որում այդ պարույրները նաև իրար վրան ուղղված: Յուրաքանչյուր շղթա իր հերթին կազմված է «աղյուսիկներից»՝ հաջորդաբար միմյանց հետ կապված նուկլեոտիդներից:

ԴՆԹ-ի յուրաքանչյուր նուկլեոտիդ պարունակում է չորս տիպի ազոտական հիմքերից մեկը՝ գուանին (Գ), ադենին (Ա), թիմին (Թ) և ցիտոզին (Ց): Դրանցից յուրաքանչյուրը միացած է դեօքսիռիբոզին, որին մյուս կողմից կապված է ֆոսֆորական թթվի մնացորդը: Հարևան նուկլեոտիդները միմյանց հետ կապվում են ֆոսֆոդիեթերային կապերով, որոնք առաջանում են 3'-հիդրօքսիլային (3'-OH) և 5'-ֆոսֆատային (5'-PO₃) խմբերի միջև: Այս

յ ու ր ա հ ա տ կ ու թ յ ու ն ը պ ա յ մ ա ն ա վ ո թ ռ ու մ է Դ Ն Թ - ու մ ու ղ ղ վ ա ծ ու թ յ ա ն առ ա ջ ա գ ու մ ը, ա յ ս ի ն ք ն` ա յ ն ու ն ի 5' և 3'- ծ ա յ ր եր, ը ն դ ո թ ու մ, մ ե կ շ ղ թ ա յ ի 5'- ծ ա յ ր ի ն հ ա մ ա պ ա տ ա ս խ ա ն ու մ է մ յ ու ս շ ղ թ ա յ ի 3'- ծ ա յ ր ը (Դ Ն Թ - ի շ ղ թ ա ն եր ը հ ա կ ա զ ու գ ա հ ե ռ ե ն մ ի մ յ ա ն ց): Դ Ն Թ - ի հ ա կ ա զ ու գ ա հ ե ռ շ ղ թ ա ն եր ն ի թ ա ր ե ն մ ի ա ն ու մ լ ր ա ց մ ա ն (կ ո մ ա լ ե մ ե ն տ ա ր ու թ յ ա ն) ս կ գ բ ու ն ք ի հ ա մ ա ճ ա յ ն. յ ու ր ա ք ա ն չ յ ու ր շ ղ թ ա յ ի Ա - ի դ ի մ ա ց մ յ ու ս շ ղ թ ա յ ու մ Թ - ն է, Գ - ի դ ի մ ա ց` Ց - ն [32,39]:

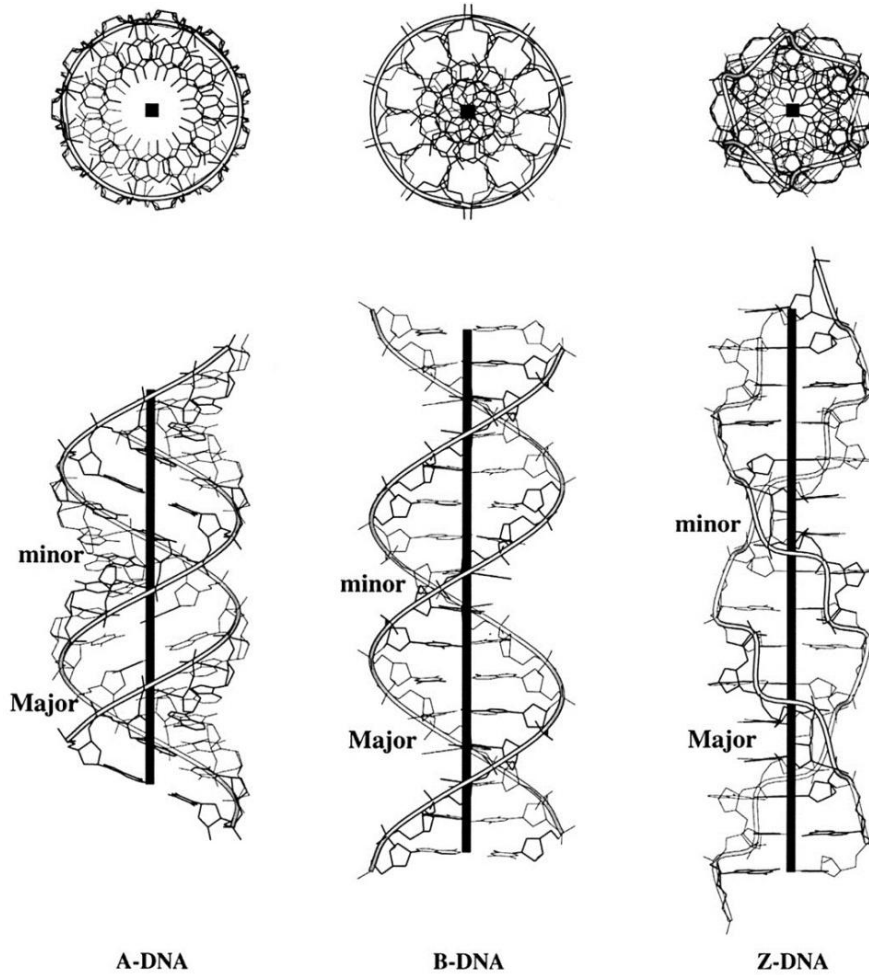
Ու ն ե ն ա լ ո վ առ ա ջ ի ն հ ա յ ա ց ք ի ց պ ա ր գ թ վ ա ց ո ղ ա յ ս ա փ ս ի կ առ ու ց վ ա ծ ք, ի թ ա կ ա ն ու մ Դ Ն Թ - ն բ ա վ ա կ ա ն ի ն բ ա ր դ և, դ ե ռ և ս գ ա ղ տ ն ի ք ն եր ո վ լ ի հ ա մ ա կ ա ր գ է: Ա յ ն գ ե ն ե տ ի կ ա կ ա ն տ ե ղ ե կ ա տ վ ու թ յ ա ն կ թ ո ղ ն է, ո թ ը ն եր կ ա յ ա ց վ ա ծ է ն ու կ լ ե ո տ ի դ ա յ ի ն հ ա ջ ո թ դ ա կ ա ն ու թ յ ու ն ն եր ի տ ե ս ք ո վ: Վ եր ջ ի ն ն եր ս մ ո լ ե կ ու լ ի եր կ ա ր ու թ յ ա մ բ գ ծ ա յ ի ն կ ա ր գ ո վ դ ա ս ա վ ո թ ղ ե լ ո վ` ե ռ յ ա կ ն եր ի տ ե ս ք ո վ կ ա զ մ ա վ ո թ ռ ու մ ե ն գ ե ն ե տ ի կ ա կ ա ն գ ա ղ տ ն ա գ ի թ ը:

Ի ս կ ո ղ ջ ժ առ ա ն գ ա կ ա ն տ ե ղ ե կ ա տ վ ու թ յ ու ն ը ս եր ն դ ի ց ս եր ու ն դ փ ո խ ա ն ց վ ու մ է բ ջ ջ ի բ ա ժ ա ն մ ա ն ը ն ա փ ո թ թ ո ղ մ ի կ ա ր ն ո թ ա գ ու յ ն գ ո թ ծ ը ն թ ա ց ի` Դ Ն Թ - ի կ թ կ ն ա պ ա տ կ մ ա ն մ ի ջ ո ց ո վ: Ծ ն ո թ ի ի վ ի թ եր կ շ ղ թ ա կ առ ու ց վ ա ծ ք ի, Դ Ն Թ - ն ա պ ա հ ո վ ու մ է ն ա ն ա յ դ տ ե ղ ե կ ա տ վ ու թ յ ա ն պ ա հ պ ա ն ու մ ը գ թ ե թ ե ա ն փ ո փ ո խ տ ե ս ք ո վ: Ս ա կ ա յ ն ն ու կ լ ե ո տ ի դ ն եր ի հ ա ջ ո թ դ ա կ ա ն ու թ յ ու ն ը կ ա ր ո ղ է ն ա ն փ ո փ ո խ վ ե լ, ի ն չ ը կ ա ր ո ղ է բ եր ե լ օ թ գ ա ն ի գ մ ու մ գ ե ն ե տ ի կ ա կ ա ն խ ա փ ա տ ու մ ն եր ի` մ ու տ ա ց ի ա ն եր ի [32,39]:

Հ ա տ կ ա ն շ ա կ ա ն է ա յ ն փ ա ս տ ը, ո թ Դ Ն Թ - ի ն ա տ ի վ մ ո լ ե կ ու լ ը փ ո փ ո խ ա կ ա ն է տ ա ր ա ճ ա կ ա ն կ առ ու ց վ ա ծ ք ի առ ու մ ո վ, ա յ ս ի ն ք ն կ ա ր ո ղ է առ ա ջ ա ց ն ե լ ի թ ա ր ի ց տ ա ր բ եր վ ո ղ կ թ կ ն ա կ ի պ ա ր ու յ ը ն եր, ո թ ո ն ք ու ն ե ն ո թ ո շ ա կ ի կ ե ն ս ա ք ա ն ա կ ա ն ն շ ա ն ա կ ու թ յ ու ն և դ թ ա ն ք կ ո չ վ ու մ ե ն Դ Ն Թ - ի կ ա ն ո ն ի կ կ առ ու ց վ ա ծ ք ն եր (ն կ ա ր 7) [39]: Ս ա կ ա յ ն պ ա ր գ վ ու մ է, ո թ Դ Ն Թ - ն կ ա ր ո ղ է առ ա ջ ա ց ն ե լ ն ա ն ա յ լ ը ն տ ր ա ն ք ա յ ի ն կ առ ու ց վ ա ծ ք ն եր [40]: Մ ա ս ն ա վ ո թ ա պ ե ս, Դ Ն Թ - ու մ փ ո խ լ ր ա ց ն ո ղ (կ ո մ ա լ ե մ ե ն տ ա ր) հ ա տ վ ա ճ ն եր ի հ ե տ մ ե կ տ ե ղ կ ա ր ո ղ ե ն հ ա ն դ ի պ ե լ ն ա ն ո չ փ ո խ լ ր ա ց ն ո ղ հ ա տ վ ա ճ ն եր` հ ա ն գ ե ց ն ե լ ո վ ց ց վ ա ծ ք ն եր ի, հ ա ն գ ու յ ց ն եր ի, ծ ա մ կ ա լ ն եր ի, ճ յ ու ղ ա վ ո թ ռ ու մ ն եր ի առ ա ջ ա ց մ ա ն և ա յ լ ն [32]:

Դ Ն Թ - ի Զ - ձ և ը. Ս ա Դ Ն Թ - ի ձ ա փ ա կ ո ղ մ յ ա ն պ ա ր ու յ ը է (ի տ ա ր բ եր ու թ յ ու ն կ ա ն ո ն ի կ, ա ջ ա կ ո ղ մ յ ա ն պ ա ր ու թ ա վ ո թ ռ ու մ ու ն ե ց ո ղ A- և B- ձ և եր ի): Ա յ ն 1979թ. բ ա ց ա հ ա յ տ ե լ է Ա. Ռ ի չ ը` d(CG)3

հեքսանուկլեոտիդի կառուցվածքի ուսումնասիրման ժամանակ: Եթե poly(dG-dC) պոլիմերը կառուցվում է MgCl₂-ի, NaCl-ի կամ



Նկար 7. ԴՆԹ-ի կանոնիկ A-, B- և ոչ կանոնիկ Z- ձևերը [32].

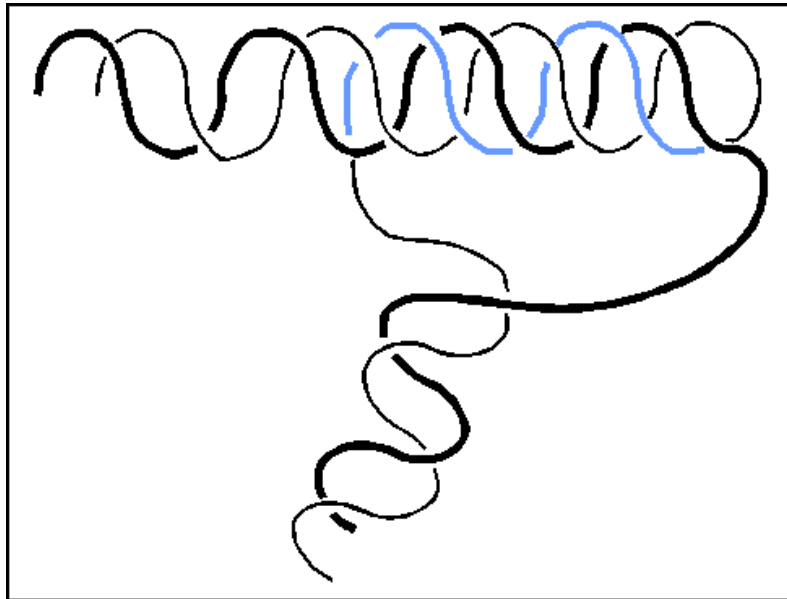
սպիրտի բարձր կոնցենտրացիայով ջրային լուծույթի մեջ, ապա կառաջ անաձախակողմյան, կրկնակի Z-պարույր [41,42]:

Պարույրի կրկնվող միավորը ոչ թե նուկլեոտիդների զույգն է, այլ հարևան երկու զույգերը: Z-ԴՆԹ-ի փոխընթացող շղթաներից յուրաքանչյուրում տեղի է ունենում շաքարի օղակի նկատմամբ ազոտային հիմքի օղակի սին- և անտի- կողմնորոշումների հաջորդում, ընդ որում, յուրաքանչյուր զույգ հիմքերից մեկը գլիկոզիդային կապի նկատմամբ միշտ սին-կողմնորոշմամբ է, մյուսը՝ անտի: Չնայած այսպիսի կառուցվածքը ձևավորվում է հիմնականում հոմոպուլինուկլեոտիդներում, իսկ ԴՆԹ-ն իրենից ներկայացնում է նուկլեոտիդների պատահական բաշխմամբ հետերոպուլինուկլեոտիդ, այնուամենայնիվ Z-ԴՆԹ-ն ունի կենսաբանական նշանակություն, քանի որ որոշ կենդանի օրգանիզմներից անջատված են այդ ԴՆԹ-ի նկատմամբ սինթեզված հակամարմիններ [32,39-42]:

ԴՆԹի V-ձևը: Սա ԴՆԹ-ի այնպիսի կառուցվածք է, որը լուծույթում ընդունում է փակ օղակների տեսք: Վերջիններս, լինելով փոխընթացող, շղթայակցված չեն միմյանց հետ (նկար 8): Տոպոլոգիական սահմանափակումների պատճառով այդպիսի օղակներն ամբողջ երկարությամբ չեն կարող առաջացնել աջակողմյան կրկնակի պարույրներ: Տարբեր մեթոդներով ցույց է տրվել, որ V-ձևում հիմքերի 30%-ն առաջացնում է ձախակողմյան Z-պարույր և նույնքան էլ B-պարույր, իսկ ԴՆԹ-ի մնացած մասը միաշղթա վիճակում է:

ԴՆԹի եռաշղթա պարույր. Երբեմն ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի մեծ ակոսի մեջ կարող է տեղակայվել ևս մեկ՝ երրորդ շղթան, որի հետևանքով առաջանում է եռակի պարույր, որն ունի կրկնակի պարույրից տարբերվող տարածական կառուցվածք, ջրածնային կապերի համակարգ և հիդրատային թաղանթ: Այսպիսի տրիպլեքսային կառուցվածք (ԴՆԹ-ի H-ձև) փորձարարական եղանակով հայտնաբերվել է գերպարուրված պլազմիդներում [43,44]: Դրանց ԴՆԹ-ն պարունակում է հոմոպուրինային և հոմոպիրիմիդինային հատվածներ, որոնք միմյանց հայելային կրկնություններն են (այդ ձևի մասին առաջին անգամ խոսել է Մաքսիմ Ֆրանկ-Կամենեցկին): Յարկ է նշել, որ ԴՆԹ-ի

ոչ կանոնիկ (այլ ընտրանքային) կառուցվածքային ձևերը կարևոր դեր են խաղում բջջում նույլ եինաթթուների գործառնության մեջ, մասնավորապես,



Նկար 8. ԴՆԹ-ի V կառուցվածքը [43]:

կրկնապատկման ժամանակ առաջանում է եռակի ճյուղավորում (ռեպլիկացիոն եռաժանի): Առաջին անգամ եռաշղթա պարույրներ հայտնաբերվել են ավելի քան 30 տարի առաջ [43,44]:

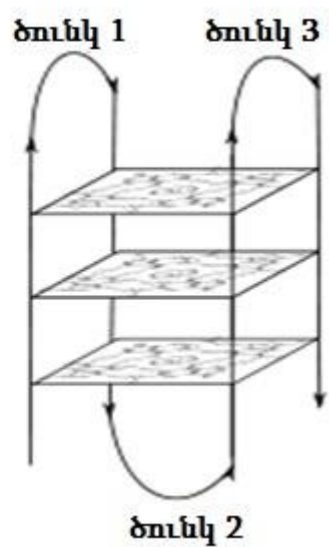
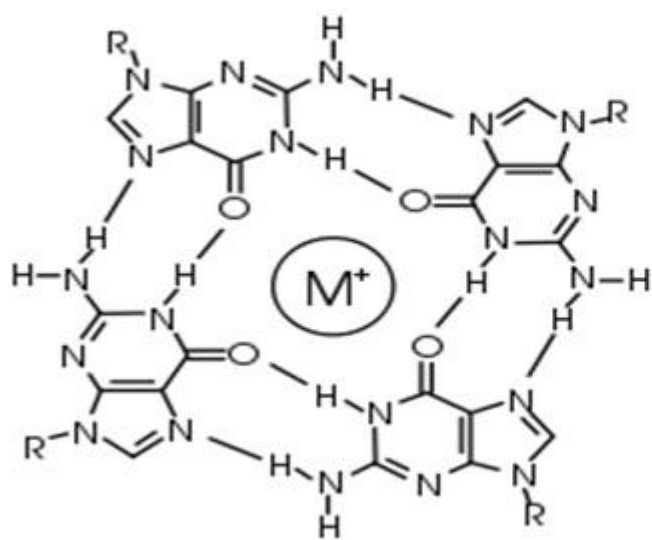
Եռաշղթա պարույրների մասին առաջին հետազոտություններում ցույց է տրվել, որ որոշ հոմոպուրին-հոմոպիրիմիդինային երկշղթա պուրինոկլեոտիդները կարող են կառուցվածքային անցումների ենթարկվել՝ առաջացնելով եռաշղթա կառուցվածքներ, որոնք պարունակում են մեկ հոմոպուրինային և երկու հոմոպիրիմիդինային շղթաներ (Py-Pu-Py տրիպլեքս): Չայտնաբերվել են նաև եռաշղթա պարույրներ, որոնք կազմված են մեկ հոմոպիրիմիդինային և երկու հոմոպուրինային շղթաներից (Py-Pu-Pu տրիպլեքս):

Տրիպլեքսների կառուցվածքը պատկերացվում էր հետևյալ կերպ. երկշղթա պարույրում ուռթսոն-կրիկյան գույգերը պահպանվում են, իսկ երրորդ շղթայի ազոտային հիմքերը երկշղթա պարույրի պուրինային հիմքերի հետ ձևավորում են ջրածնական կապեր: Ազոտային հիմքերի միջև այդպիսի կապերը կոչվում են հյուսվածքային [43,44]:

Մինչև 20-րդ դարի 80-ականների կեսը եռաշղթա կառույցները քիչ են հետազոտվել, չնայած այն հանգամանքին, որ բացահայտվել էր դրանց կարևոր դերը փ-ԴՆԹ-ի տարածական կառուցվածքի կայունացման մեջ: Չեփաբերությունն այդ կառույցների նկատմամբ մեծացավ, երբ 1986 թ. հայտնաբերվեց ԴՆԹ-ի կառույցներից մեկը՝ H-ձևը [43,44]:

Քառաշղթա պարույր. Դա գուանինային մնացորդներով հարուստ օլիգոնուկլեոտիդների ինքնակազմավորվող կառուցվածք է, որը կազմված է քառյակներից: Քառյակները բաղկացած են չորս համահարթ, իրար միացած գուանիններից և կապված են հյուսվածքային ջրածնային կապերով: Այս կառուցվածքը հայտնի է դարձել գրեթե 50 տարի առաջ:

Ցույց է տրվել, որ poly(G)-ից կազմված շղթաներն իրենցից ներկայացնում են ԴՆԹ-ի փաթեթավորման նոր տեսակ՝ քառաշղթա պարույր, որտեղ տարբեր շղթաների չորս գուանինային հիմքերն առաջացնում են հարթ կառուցվածք (նկար 9):



ԴՆԹ-ի քառաշղթա կառույցը, որը ձևավորվում էր *in vitro*, չի դիտարկվել որպես օրինաչափություն, որն իր կարևոր նշանակությունն ունի կենդանի բնության մեջ, այլ համարվել է ինչ-որ ոչ սովորական երևույթ [45-51]: Սակայն, մի շարք հետազոտությունների արդյունքում ստացվել են հակամարմիններ, որոնք կարող են ճանաչել և կապվել մարդու գենոմի G-քառաշղթա կառույցներով հարուստ հատվածների հետ [45-51]: Դա մարդու բջիջներում ԴՆԹ-ի այդ կառույցների գոյության կարևոր ապացույց է:

Լուսարձակող (ֆլուորեսցենսային) նյութերով նշված հակամարմինների օգնությամբ հետազոտողները տեսանելի են դարձրել քառաշղթա կառույցները՝ հայտնաբերելով դրանց տեղակայման հատվածները, ինչպես նաև՝ դրանց խտության ավելացումը բջիջ բաժանման փուլում:

Այդպիսի կառուցվածքները տարբերվում են լուծույթում բարձր կայունությամբ և կոչվում են գուանինային (G)-քառյակներ կամ (G)-տետրադներ: Յուրաքանչյուր (G)-քառյակ պարունակում է ութ ջրածնային կապեր, որոնք առաջանում են մեկ գուանինային հիմքի ուոթսոն-կրիկյան կողմի և մյուսի հյուստենյան կողմի հետ փոխազդեցության միջոցով:

Գործառական դեր ունեցող գուանինային մնացորդներով հարուստ հատվածներ *in vivo* հայտնաբերվել են գենոմի կենսաբանորեն կարևոր տեղամասերում՝ թելոմերներում և իմունոգլոբուլինների սինթեզը վերահսկող հատվածներում [45-51]: Քառաշղթա կառուցվածքներ առաջացնող պրոմոտորային տեղամասեր են հայտնաբերվել նաև մի շարք ուռուցքածին գեներում և ուռուցքների հետ «միավորված» այլ գեներում: G-ԴՆԹ/ԴՆԹ քառաշղթա կառուցվածքները համարվում են նաև հեռանկարային թերապևտիկ միջոցներ, քանի որ ԴՆԹ- և ԴՆԹ-ային ապտամերները, որոնք ընտրված են հատկորոշիչ թիրախների համար, ձևավորում են քառաշղթա կառույցներ: Այսպիսով, ԴՆԹ-ի քառաշղթա ձևերի և՛ տարածական կառուցվածքը, և՛ դրա կայունությունը ժամանակակից հիմնարար և կիրառական ուսումնասիրությունների կարևորագույն առարկաներ:

Թելոմերների գործառույթը կայանում է վերահամակցումների կամ նուկլեազների ազդեցության արդյունքում առաջացող հնարավոր վնասվածքներից պաշտպանության մեջ:

Դրանք ԴՆԹ-ի հաջորդականություններ են, որոնք գտնվելով քրոմոսոմների ծայրերում, պատասխանատու են, մասնավորապես, քաղցկեղային բջիջների «արուլիֆերացիայի» համար: Թելոմերային ԴՆԹ-ն իրենից ներկայացնում է poly(G)-հաջորդականությունների հեքսամերների «շղթաներ», որոնք երբեմն կարող են նաև պարունակել ադենինային (A) կամ թիմինային (T) մնացորդներ՝ (GGTTAG)_n կամ (TTAGGG)_n, ընդ որում, թելոմերային ԴՆԹ-ն միավորված է թելոմերային սպիտակուլների հետ:

Կրկնությունների տիպը կախված է տեսակից: (TTAGGG)_n կրկնությունը բնորոշ է կաթնասուններին [45-51]: G-քառաշղթա կառույցների ձևավորումը և կառուցվածքի կայունությունը կախված են մի շարք գործոններից. հիմքերի միջև ուղղահայաց (ստեկինգ) փոխազդեցություններից, ջրածնային կապերից, էլեկտրաստատիկ փոխազդեցություններից և ջրային թաղանթից: Բացի կառուցվածքը կայունացնող այդ փոխազդեցություններից, քառաշղթա կառույցներում առկա են նաև հատկորոշիչ գործոններ՝ գուանինի կարբոնիլի Օ₆-ի կոորդինացումը կատիոններով և G-քառաշղթա կառույցներում մշտապես առկա միա- և երկշղթա կառուցվածքներից կազմված օղակները: Մարդու գենոմում, սովորական պայմաններում, ԴՆԹ-ի քառաշղթա կառույցները հավասարաչափ են բաշխված: G-քառաշղթա կառույցների քանակի ու ժգին մեծացումը դիտվում է ինտերֆազի S-փուլում, որի ժամանակ տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի կրկնապատկումը, որը բջջի բաժանմանը նախորդող կարևորագույն գործընթացն է [45-51]:

Ուռուցքածին գեներում ԴՆԹ-ի կրկնապատկման արագության մեծացումը հանգեցնում է G-քառաշղթա կառույցների քանակի և ակտիվության ավելացմանը, ուստի բջիջների վտանգավոր ակտիվությունը կարելի է կառավարել G-քառաշղթա կառույցները որպես մոլեկուլային թիրախ ճանաչող հատուկ սինթեզված փոքր մոլեկուլների միջոցով: Դա նշանակում է, որ G-քառաշղթա կառույցներն իրենցից ներկայացնում են արտենցիալ մոլեկուլային թիրախներ՝ հակաքաղցկեղային միացությունների

համար և, հետևաբար, բավական արժեքավոր են դառնում այդ կառույցների հետ ցածրամուլեկուլային միացությունների փոխազդեցության մեխանիզմների, ինչպես նաև՝ այդ միացությունների՝ թելոմերների կրկնապատկումը ճնշող դերի ուսումնասիրությունները [45-51]:

Յեռանկարային են նաև այն հետազոտությունները, որոնք միտված են բացահայտելու G-քառաշղթա կառույցների կայունացումը և հետագա երկարաձգման կանխումը ցածրամուլեկուլային միացությունների միջոցով:

Այսպիսով հարկ է նշել, որ ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքը և նրա գործառական հատկությունները բավականաչափ հետազոտված են, մինչդեռ նրա այլընտրանքային տարածական կառուցվածքների ֆունկցիոնալ հատկությունները դեռևս լիովին պարզաբանված չեն, չնայած դրանք ունեն կենսաբանական մեծ նշանակություն և կարևոր կիրառական հատկություններ:

ԳԼՈՒԽ 2.

ՆՅՈՒԹԵՐ և ՄԵԹՈԴՆԵՐ

2.1. Օգտագործված պրեպարատները

Աշխատանքում օգտագործվել են հորթի ուրցագեղձից անջատված գերմաքուր ԴՆԹ (<<Sigma>>, ԱՄՆ), սինթետիկ պոլիմերային պոլիմերներ poly(dA)-poly(dT), poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] (շղթայի միանունյն երկարությամբ), poly(dA), poly(G) (<<Sigma>>, ԱՄՆ), էթիդիոլմի բրոմիդ (<<Serva>>, Գերմանիա), մեթիլեն կապուլյտ (<<Sigma>>, ԱՄՆ), NaCl, նատրիումի ցիտրատ, էթիլենդիամինտետրաացետատ (ԷԴՏԱ), HCl (գերմաքուր): Բոլոր պրեպարատներն օգտագործվել են առանց լրացուցիչ մաքրման: Օգտագործված պրեպարատների կոնցենտրացիաները որոշվել են կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդով՝ օգտագործելով մարման մոլային գործակցի հետևյալ արժեքները. հորթի ուրցագեղձի ԴՆԹ - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$, poly(dA)-poly(dT) - $\epsilon_{260}=6000 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$, poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] - $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$, poly(dA) - $\epsilon_{260}=10,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$, poly(G) $\epsilon_{260}=9900 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$, ԷԲ - $\epsilon_{480}=5600 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$, ՄԿ - $\epsilon_{664}=76000 \text{ M}^{-1}\text{u m}^{-1}$:

Ջեռագոտության իրականացվել են ստանդարտ աղացիտրատային լուծույթում (1xSSC), որը պարունակում է 0.15 M NaCl, 0,015M եռտեղակալված նատրիումի ցիտրատ, 10^{-5} M ԷԴՏԱ), լուծույթի համապատասխան իոնական ուժերի, ջերմաստիճանների և pH-ի արժեքների պայմաններում: Անհրաժեշտ իոնական ուժերով լուծույթների ստացման համար 1xSSC-ն նոսրացվել է կրկնակի թորված ջրով:

2.2. Օգտագործված սարքավորումները

Սպեկտրաֆոտոմետրիկ չափումներն իրականացվել են միաճառագայթ Jenway 6715 UV-VIS (Մեծ Բրիտանիա) և երկճառագայթ PIE Unicam SP8-100 (Մեծ Բրիտանիա) սպեկտրաֆոտոմետրերի միջոցով, հերմետիկորեն փակված կվարցե, 1սմ օպտիկական ճանապարհ ունեցող կյուվետներում: PIE Unicam SP8-100 սպեկտրաֆոտոմետրի

զգայ ու նությ ու նը սպեկտրի աշխատանքային տիրույթում համապատասխանում է $\Delta I/I=10^{-4}$ ինտենսիվության փոփոխությանը, որը հանգեցնում է 3-5% սխալի:

Բացարձակ կլանման գրանցման ժամանակ որպես հիմնական ընտրվել է SSC-ի կլանումը: Դիֆերենցիալ կլանման գրանցման ժամանակ՝ լիզանդիլ ու ծուլթի կլանումը:

Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները գրանցվել են Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Ավստրալիա) սպեկտրաֆլյուորիմետրի միջոցով:

Լուծույթների pH-ի արժեքները չափվել են ՅՅ-74 (ԽՍՀՄ) ունիվերսալ իոնոմետրի օգնությամբ, օգտագործելով ՅՇՈ 63-07 չափող էլեկտրոդ: ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի հետ դրա կոմպլեքսների լուծույթները տիտրվել են 0,2Ն աղաթթվով, խառնումը իրականացվել է մագնիսական խառնիչի վրա: Չափումների սխալը չի գերազանցել pH-ի տատանման ± 0.02 արժեքը: pH չափումներն իրականացվել են 25°C ջերմաստիճանում՝ pH-ի չեզոք (pH \approx 7,0) և թթվային (pH \approx 5,5; pH \approx 3,5; pH \approx 2,5) արժեքների դեպքերում: Նշված արժեքները ընտրվել են այն պատճառով, որ $7,0 \geq \text{pH} \geq 4,0$, և $3,0 > \text{pH} \geq 2,5$ միջակայքերում poly(dA)-ն գտնվում է միաշղթա վիճակում, իսկ $4,0 > \text{pH} > 3,0$ միջակայքում՝ երկշղթա:

Լիզանդիլների աշխատանքային լուծույթների տիտրումը ԴՆԹ-ի լուծույթով իրականացվել է 10մլ ծավալով միկրոպիպետով (<<Hamilton>>, ԱՄՆ):

2.3. Նուկլեինաթթուների հետ լիզանդիլների կոմպլեքսների պատրաստումը

Արոմատիկ քրոմոֆորային օղակների խմբեր պարունակող միացությունները, մասնավորապես, ԷԲ-ը, ՄԿ-ը և այլն, մեծ կոնցենտրացիաների ($>1,5 \cdot 10^{-4}$) դեպքում լուծույթում կարող են առաջացնել դիմերներ: Ուստի, արլինուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների հետ աշխատելիս պետք է հաշվի առնել այդ փաստը և օգտագործել լիզանդիլայնափսի կոնցենտրացիաներ, որոնց դեպքում դիմերի զացումը կլինի չնչին և այն կարելի է անտեսել:

Պարզ դիմերի զացման դեպքում հնարավոր է որոշել դիմերների և մոնոմերների կոնցենտրացիաները: ԷԲ-ի դիմերի զացման հավասարակշռության հաստատունը $t=25^{\circ}\text{C}$ -ի դեպքում՝ $K=70 \text{ մոլ}^{-1}$: Պարզ դիմերի զացման դեպքում $2C_U \rightarrow C_n$, որտեղ C_U – մոնոմերի կոնցենտրացիան է, իսկ C_n -ն՝ դիմերների, ուստի.

$$C_n = K C_U^2.$$

ԷԲ-ի ընդհանուր կոնցենտրացիան կլինի.

$$C_0 = C_U + 2C_n \text{ կամ } C_0 = C_U + 2K C_U^2.$$

Մեր հետազոտություններում ԷԲ-ի կոնցենտրացիան եղել է $\sim 10^{-5}$ մոլ, ուստի այդ արժեքը տեղադրելով նշված բանաձևի մեջ և հաշվի առնելով դիմերի զացման հաստատունի մեծությունը, մեր կողմից որոշվել են ԷԲ-ի մոնոմերային և դիմերային ձևերի կոնցենտրացիաները (տես [30]): Ըստ ստացված տվյալների՝ դիմերների կոնցենտրացիան կազմել է $\approx 0,1\%$, ուստի այն մեր կողմից անտեսվել է:

2.4 Նուկլեինաթթուների հետլիզանդների կոմպլեքսների սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունը

Սպեկտրասկոպիկ (կլանման, դիֆերենցիալ կլանման և ֆլուորեսցենտային) չափումների ժամանակ լուծույթում ԷԲ-ի կոնցենտրացիան մնացել է հաստատուն, իսկ նուկլեինաթթվի (ԴՆԹ, պլիևոկլետոֆոներ) կոնցենտրացիան աճել է տիրման ընթացքում: ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները գրանցվել են $400 \leq \lambda \leq 600$ նմ միջակայքում:

ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների ուսումնասիրության դեպքում կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդով չափումներն իրականացվել են ալիքի երկարության փոփոխության $500 \leq \lambda \leq 750$ նմ միջակայքում:

Դիֆերենցիալ սպեկտրների ստացման համար կոմպլեքսների լուծույթի կլանումը գրանցվել է ազատ լիզանդի լուծույթի նկատմամբ. ԷԲ-ի դեպքում՝ $\lambda=400-600$ նմ միջակայքում, ՄԿ-ի դեպքում՝ $\lambda=500-750$ նմ միջակայքում: Ընդ որում, լիզանդի կոնցենտրացիան ստուգիչ և հետազոտվող լուծույթներում եղել է միանման:

Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության սպեկտրները E_F -նուկլեինաթթու կոմպլեքսների համար գրանցվել են $500 \leq \lambda \leq 750$ նմ միջակայքում, երբ գրգռման ալիքի երկարությունը եղել է 480 նմ: Ուսումնասիրության ընթացքում E_F -ի կոնցենտրացիան մնացել է հաստատուն, իսկ նուկլեինաթթվի կոնցենտրացիան լուծույթում մեծացել է: Նուկլեինաթթվի հետ կապված E_F -ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը աճել է մինչև որոշակի արժեքները, որից հետո փոփոխություն չի գրանցվել:

2.5. Կապման կորերի կառուցումը Սկետչ արդի կոորդինատներով

Լիգանդ-նուկլեինաթթու կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներից r/C_f և r արժեքները ստանալու համար որոշվել է Լիգանդի ազատ մոլեկուլների կոնցենտրացիան՝ C_f -ը, հետևյալ բանաձևից:

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \quad (13)$$

որտեղ A -ն կոմպլեքսի կլանումն է Լիգանդի տվյալ կոնցենտրացիայի դեպքում, A_0 -ն և A_∞ -ը համապատասխանաբար Լիգանդի ազատ և կապված մոլեկուլների կլանումներն են, $C_0 = C_f + C_b$ – Լիգանդի լրիվ կոնցենտրացիան է լուծույթում, $r = C_b/C_p$, որտեղ C_b -ն Լիգանդի կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան է, C_p -ն նուկլեոտիդի ֆոսֆատային խմբերի կոնցենտրացիան:

Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների միջոցով Լիգանդի կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան հաշվարկվել է ըստ հետևյալ բանաձևի.

$$\frac{c_r^\Phi(t)}{c_0(t)} = \frac{[I(t) - I_1(t)]}{[I_2(t) - I_1(t)]}, \quad (14)$$

որտեղ $I(t)$ -ն հետազոտվող նմուշի, $I_1(t)$ -ն Լիգանդի ազատ, $I_2(t)$ -ն՝ Լրիվ կապված մոլեկուլների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություններն են ($\lambda_{գրգռման} = 480$ նմ, $\lambda_{\Phi} = 610$ նմ): $C_0 = C_1 + C_2$, որտեղ C_1 -ը E_F -ի՝ կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդով որոշված ազատ մոլեկուլների կոնցենտրացիան է, C_2 -ը՝ կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիան, ընդ որում, $C_2 = C_2^{\Phi} + C_2^{\Psi}$, որտեղ C_2^{Φ} -ը

ԷԲ-ի կապված հետլ ու սարձակող, $C_2^{\xi\phi}$ -ը՝ կապված, հետլ ու սարձակում չդրսևորող մոլեկուլների կոնցենտրացիաներն են: C_2 -ի այդ արժեքներից հաշվարկվել են $r_{\phi} = C_2^{\phi}/C_p$ և $r^{\xi\phi} = C_2^{\xi\phi}/C_p$, որտեղ $r = r^{\phi} + r^{\xi\phi}$, իսկ C_p -ն պոլիմերի եռոտիդում ֆոսֆատային խմբերի կոնցենտրացիան է:

Ըստ Սկետչարդի կոորդինատների կառուցվել են նույն եինաթթուների հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կապման կորերը հետևյալ բանաձևի միջոցով (տես [53]).

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

$$R = \left([1-(n+1)r]^2 + 4\omega r(1-nr) \right)^{1/2} \quad (15)$$

որտեղ K -ն կապման հավասարակշռական հաստատունն է, n -ը լիգանդի կապված մեկ մոլեկուլին համապատասխանող նույն եռոտիդների թիվն է, ω -ն կոոպերատիվության գործակիցը: Poly(dA)-poly(dT)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության ժամանակ $\omega > 1$: Poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ ԷԲ-ի կապման դեպքում $\omega \approx 1$, ուստի կապման կորերը կառուցվել են՝ օգտագործելով հետևյալ բանաձևը (տես [53])

$$r/C_f = K(1-nr) \left[\frac{1-nr}{1-(n-1)r} \right]^{n-1} \quad (16)$$

որը գծայնացվել է, ինչպես նկարագրված է [53]:

$$\frac{r}{c_f} = K(1-(2n-1)r) \quad (17)$$

2.6. ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների ջերմա- և pH-հրահրված պարոլյր-կծիկ անցման ուսումնասիրության սպեկտրաֆոտոմետրիկ մեթոդը

Ֆիզիոլոգիական պայմաններում, այսինքն pH-ի չեզոք արժեքների, սենյակային ջերմաստիճանի և չափավոր իոնական ուժի դեպքում ԴՆԹ-ն գտնվում է երկշղթա վիճակում: Ջերմաստիճանի բավականաչափ բարձրացման, դեպի թթվային կամ հիմնային արժեքները pH-ի փոփոխության, տարբեր տեսակի միացությունների ավելացման դեպքում տեղի է ունենում պարոլյր-կծիկ անցում, որի ժամանակ ԴՆԹ-ի կրկնակի պարոլյրը քանդվում է և մոլեկուլը անցնում է չկարգավորված, կծիկային վիճակի: Այս անցումը կարելի է հետազոտել տարբեր, այդ թվում նաև, ուլտրամանուշակագույն

(ԴՆԹ-ի կլանման) տիրույթում կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով (տես [39]):

ՈւՄ տիրույթում կլանման սպեկտրի գրանցման առավել ությունը կայանում է նրանում, որ այն ուղղակիորեն կապված է ԴՆԹ-ի հալման աստիճանի հետ (պարույր/կծիկ հարաբերության հետ): Սովորաբար հալման կորերի (ջերմաստիճանից 1-9-ի կախվածության կորը) կառուցման համար օգտագործում են տվյալ ջերմաստիճանում քանդված հիմքերի զույգերի մասնաբաժինը (1-9), որը կապված է ՈւՄ կլանման հետ հետևյալ հարաբերությամբ.

$$1 - \mathcal{G} = \frac{A_T - A_{\text{ադ}}}{A_{\text{կծ}} - A_{\text{ադ}}} \quad (18)$$

$A_{\text{ադ}}$ -ը և $A_{\text{կծ}}$ -ը ԴՆԹ-ի կլանումներն են պարուրային և կծիկաձև վիճակներում, A_T -ն՝ տվյալ ջերմաստիճանում: Յալման կորը բնութագրվում է երկու պարամետրերով՝ հալման ջերմաստիճանով T_m , որը համապատասխանում է այն կետին, որի դեպքում ԴՆԹ-ի 50%-ը գտնում է կծիկաձև վիճակում և հալման ջերմաստիճանի լայնությամբ՝ ΔT , որը որոշվում է հալման կորին, հալման կետում տարված շոշափողով.

$$\Delta T = \left(\frac{\partial \mathcal{G}}{\partial T} \right)_{T=T_m}^{-1} \quad (19)$$

Բնափոխման պրոցեսը դարձելի է, քանի որ որոշակի պայմաններում ԴՆԹ-ի իրարից հեռացած շղթաները կարելի է գրեթե ամբողջությամբ վերամիավորել: Այս պրոցեսը կոչվում է ռենատուրացիա, որը լայնորեն օգտագործվում է զանազան հետազոտություններում (տես [39]):

ԳԼՈՒԽ 3.

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

3.1. ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսի պարունյր-կծիկ անցումը

ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների փոխազդեցության մեխանիզմները հասկանալու համար անհրաժեշտ է լուծույթի տարբեր պայմաններում (իոնական ուժ, pH, տարբեր միացությունների առկայություն) հետազոտել կոմպլեքսների կառուցվածքն ու կայունությունը, քանի որ լիգանդների մեծ մասը ԴՆԹ-ի հետ փոխազդում են մի քանի եղանակներով [30,33,39]: Ակրիդինային կամ ֆենանտրիդինային ներկանյութերը, այդ թվում, ալրիդին նարնջագույնը (ԱՆ), պրոֆլավինը (ՊՖ), ԷԲ-ն (նկար 4), լինելով մուտագեն կամ քաղցկեղածին, ԴՆԹ-ի հետ կապման եղանակից կախված՝ կարող են ցուցաբերել հակաբիոտիկային հատկություններ [18,54-56]: Ընդ որում, այս միացությունների կենսաբանական ակտիվությունն առաջին հերթին պայմանավորված է կապման ինտերկալյացիոն եղանակով, ինչի արդյունքում տեղի են ունենում ԴՆԹ-ի կրկնակի պարունյրի կառուցվածքային փոփոխություններ, ինչպես նաև ԴՆԹ-ի ֆունկցիաների արգելակում [54-56]: ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսներն ուսումնասիրված են բազմաթիվ աշխատանքներում, որտեղ ներկայացված են տարբեր տիպի կոմպլեքսների առաջացման մեխանիզմները՝ լուծույթի իոնական ուժից և r=ԷԲ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունից կախված [57-61]: Մասնավորապես, ցույց է տրված, որ r-ի փոքր արժեքների դեպքում հիմնականում դրսևորվում է ինտերկալյացիոն փոխազդեցությունը, իսկ ավելի մեծ արժեքների դեպքում նաև՝ կապման արտաքին եղանակը [57]:

Ինտերկալյացիոն փոխազդեցությունն էապես ազդում է ԴՆԹ-ի կառուցվածքի վրա [3,32]: Օրինակ՝ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի ինտերկալյացիոն փոխազդեցությունը հանգեցնում է ԴՆԹ-ի B-ձևի 20°-ով պտտմանը և կրկնակի պարունյրի երկարության մեծացմանը [32]:

Չայտնի է, որ գործառնության ընթացքում ԴՆԹ-ն կարող է գտնվել ինչպես երկշղթա, այնպես էլ միաշղթա վիճակներում: Չետնաբար կարելի է դիտարկել 2 տիպի կոնֆորմացիոն անցումներ ԴՆԹ-ում՝ երկշղթա կառուցվածքի խախտմամբ կամ առանց դրա [62]: Ընդ

որում, մի կոնֆորմացիոն վիճակից մյուսին անցումը տեղի է ունենում որոշակի, ոչ 0-ական միջակայքում՝ ԴՆԹ-ի վրա ազդող որևէ արտաքին պարամետրի փոփոխման ժամանակ (ջերմաստիճան, pH, իոնական ուժ և այլն [62]): Միևնույն ժամանակ, տվյալ անցումների վրա կարող են ազդել տարբեր մոլեկուլներ: Մասնավորապես EԲ-ը, ակտինոմիոցին Դ-ն, պրոֆլավինը Hoechst 33258 (H33258), մեթիլեն կապույտը (ՄԿ) ԴՆԹ-ի հետկապվում են ինչպես in vivo, այնպես էլ in vitro և ազդում են ԴՆԹ-ի ֆունկցիոնալ ակտիվության վրա [61-69]: Այս լիգանդների կապման ժամանակ՝ կախված կոնցենտրացիայից, տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցման կետի տեղաշարժ, միաժամանակ փոփոխվում է անցման միջակայքի լայնությունը [61,62]: Նշված անցումները տարբերվում են ըստ մեխանիզմի, սակայն ջերմադինամիկայի տեսանկյունից դրանք նման են և կրում են կոոպերատիվ բնույթ: ԴՆԹ-ի կենսաբանական դերը հասկանալու համար կարևոր է ԴՆԹ-ի հետ լիգանդի փոխազդեցության ժամանակ կոնֆորմացիոն փոփոխությունների ջերմադինամիկ պարամետրերի որոշումը: Վերոհիշյալ գործընթացների հիմնական ջերմադինամիկ բնութագրերից մեկը ազատ էներգիայի փոփոխությունն է, որը որոշվում է ենթալպիայի և ենթրոպիայի միջոցով [3,38,39]:

Ըստ իր որոշ բնութագրերի ԴՆԹ-ն հիշեցնում է միաչափ, ոչ պարբերական բյուրեղ, ինչը հնարավորություն է տալիս ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցումն ուսումնասիրել՝ օգտվելով հզիսգի մոդելից: Այս տեսանկյունից կարելի է համարել, որ ԴՆԹ-ի յուրաքանչյուր տարրական միավոր (հիմքերի զույգ) կարող է գտնվել 2 վիճակում՝ բյուրեղային (երկշղթա) և հալված (միաշղթա): Սակայն փուլային անցումները կատարվում են ԴՆԹ-ի վրա ազդող որևէ արտաքին պարամետրի փոփոխման ժամանակ որոշակի, ոչ 0-ական միջակայքում, քանի որ մակրոմոլեկուլի շղթայի երկայնքով տվյալ միավորի մի վիճակից մյուսին անցման վրա ազդում են նաև հարևան օղակները: Մյուս կողմից, պարույր-կծիկ անցման վրա նաև ազդում են ԴՆԹ-ն շրջապատող այլ մոլեկուլներ, որոնք կայունացնում կամ ապակայունացնում են ԴՆԹ-ի բյուրեղային, երկշղթակալ «հեղուկ», միաշղթակառուցվածքը՝ կախված կծիկանման կամ պարուրած և ԴՆԹ-ի հետ լիգանդի կապման հաստատունների հարաբերությունից, որի արդյունքում տեղի է ունենում անցման

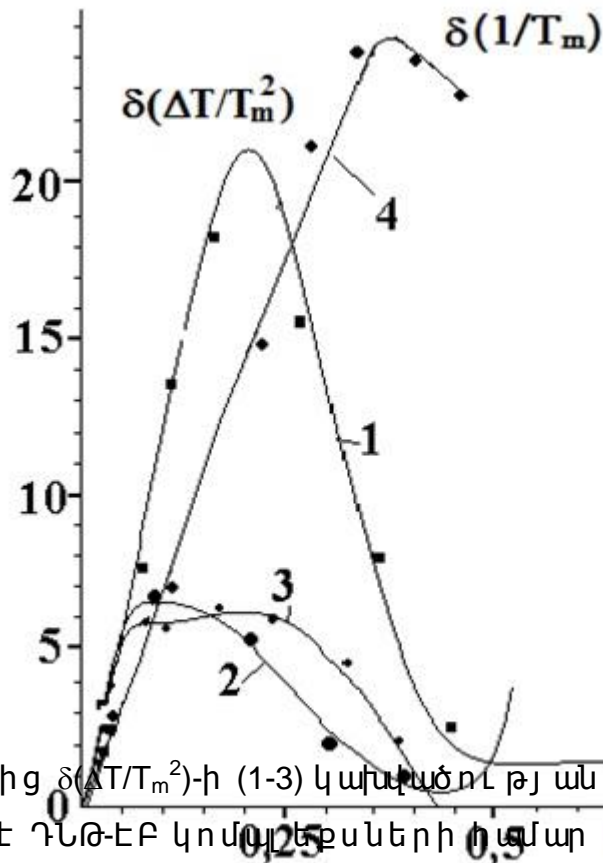
կետի տեղաշարժ և միաժամանակ փոփոխվում է անցման միջակայքի լայնությունը (օրինակ, ջերմահրահրված անցումների ժամանակ, եթե լիգանդը համարվում է երկշղթա կառուցվածքի ամրակ, հալման ջերմաստիճանը՝ T_m -ը և հալման միջակայքի լայնությունը՝ ΔT -ն աճում են) [38,70-83]: Սահնարավորություն է տալիս անուղղակիորեն որոշել անցման էնթալպիայի փոփոխությունը՝ ΔH -ը, փորձարարական եղանակով՝ չափելով կոոպերատիվ անցումների մեծությունները՝ T_m -ը և ΔT -ն:

Յիմնվելով ԷԲ-ԴՆԹ փոխազդեցության տվյալների վրա, մշակվել է լիգանդի կոնցենտրացիայից T_m -ի և ΔT -ի փոփոխությունների կախվածությունը նկարագրող տեսական մոդել (տես. [38]): Այդ մոդելի վրա հիմնված տեսական հաշվարկները և փորձարարականորեն ստացված տվյալները հաստատում են, որ անցման միջակայքի փոփոխության՝ $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի կախվածությունը լիգանդի կոնցենտրացիայից, $0 < r < 0,5$ միջակայքում, ունի գանգակաձև տեսք (նկար 10):

Լիգանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիաների փոքր հարաբերության դեպքում $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ն աճում է, այնուհետև անցնելով թույլ արտահայտված մաքսիմումով, նվազում է և, համապատասխան պայմանների պահպանման դեպքում, ձգտում է 0-ի, քանի որ $\Delta T = \Delta T_0$, որտեղ ΔT և ΔT_0 -ն համապատասխանաբար ԴՆԹ-լիգանդ կոմպլեքսների և ԴՆԹ-ի հալման միջակայքի լայնություններն են [38]: Պարոլյո-Կծիկ անցման ժամանակ լիգանդի մոլեկուլները վերաբաշխվում են ԴՆԹ-ի բնափոխված տեղամասերից դեռևս չբնափոխված տեղամասեր, ինչի արդյունքում լիգանդի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում անցման գործընթացը տեղի է ունենում ավելի լայն ջերմաստիճանային միջակայքում: ԷԲ-ի մեծ կոնցենտրացիաների պայմաններում ներկանյութի մոլեկուլի համար երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ կապման նախընտրելի բոլոր տեղերը հագնում են և անցման ընթացքում վերաբաշխվում դառնում է անհնարին, ինչի արդյունքում $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ն սկսում է նվազել:

Յետագայում, լիգանդի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ն կրկին աճում է: Ընդ որում, լիգանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերության վերը նշված միջակայքում

կոմպլեքսների $\delta(1/T_m)$ -ը ($\delta(1/T_m)=1/T_0-1/T_m$, որտեղ T_m -ը և T_0 -ն համապատասխանաբար կոմպլեքսների հալման և մաքուր ԴՆԹ-ի ջերմաստիճաններն են) աճում է, իսկ r -ի որոշակի արժեքների դեպքում, (երբ $\Delta T=\Delta T_0$), $\delta(1/T_m)$ -ը սկսում է նվազել [38]:



Նկար 10. r -ից $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի (1-3) կախվածությունը: Կոր 1-ը ստացված է ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համար լուծույթի 0.002 մոլ իոնական ուժի պայմաններում, կոր 2-ը և կոր 3-ը՝ համապատասխանաբար ԴՆԹ-ԱՄԴ և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համար՝ 0.02 մոլ իոնական ուժի պայմաններում: Կոր 4-ը համապատասխանում է r -ից $\delta(1/T_m)$ -ի կախվածությանը, որն ստացված է ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համար լուծույթի 0.02 մոլ իոնական ուժի պայմաններում: Նկարում բերված են տեսական հաշվարկների հիման վրա կառուցված կորեր, որոնց վրա տեղադրված կետերը ստացված են փորձարարականորեն [38]:

Ցույց է տրվել, որ E_F -ի դեպքում T_m -ի և ΔT -ի փոփոխությունների վարքը կախված է լուծույթի իոնական ուժից: Յիմսվելով այս փաստի վրա և հաշվի առնելով այն, որ E_F -ը լուծույթում գտնվում է կատիոնային վիճակում, ցույց է տրվել, որ այն Γ -ի հետ կարող է կապվել նաև էլեկտրաստատիկ եղանակով: Մյուս կողմից, հարկ է նշել, որ բացի էլեկտրաստատիկ և ինտերկալյացիոն եղանակներից, E_F -ը և Γ -ն կարող են փոխազդել այլ եղանակով կամ եղանակներով, ինչի հետևանքով r -ից կախված $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ն ձեռք է բերում զանգակաձև տեսք: E_F -ի դեպքում ինտերկալյացիոն փոխազդեցությունը համարվում է հիմնական կապման եղանակ և երկշղթա Γ -ի կայունացման գլխավոր գործոն [57,62]: Սակայն այս փաստը բավարար չէ r -ից $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի կախվածության կորի զանգակաձև տեսքը բացատրելու համար, քանի որ r -ի որոշակի արժեքների դեպքում ինչպես $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ն, այնպես էլ $\delta(1/T_m)$ -ը պետք է հագեցած լինեին, սակայն փորձի ընթացքում դա չի նկատվել և r -ից $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի կախվածության կորը լիզանդի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց նվազում է: Աշխատանք [38]-ում տեսականորեն հիմնավորված, իսկ [57,62]-ում փորձնականորեն հաստատված է, որ E_F -ը կարող է կապվել նաև միաշղթա Γ -ի հետ և, երբ միաշղթա և երկշղթա Γ -ի հետ կապված E_F -ի կոնցենտրացիաները հավասարվում են, $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ն հավասարվում է 0-ի: Ավելի նման պայմաններում չի բացառվում այն, որ E_F -ի մոլեկուլները նախընտրելիորեն կապվեն միայն Γ -ի միաշղթա հատվածների հետ, ինչը կհանգեցնի $\delta(\Delta T/T_m^2)$ -ի աճին և $\delta(1/T_m)$ -ի նվազմանը: Բացի այդ, աշխատանք [57]-ում ցույց է տրվել, որ երկշղթա Γ -ի հետ E_F -ն առաջացնում է ֆլյուորեսցենտային և ոչ ֆլյուորեսցենտային կոմպլեքսներ, իսկ աշխատանք [58]-ում E_F -ի և ԱՄԴ-ի համար ցույց է տրվել, որ Γ -ի շղթաներից մեկի հետ այս լիզանդները կարող են կապվել կիսաինտերկալյացիոն եղանակով, ընդ որում՝ Γ -ի հետ երկու լիզանդների ինտերկալյացիոն և կիսաինտերկալյացիոն կապման պարամետրերն իրար հետ լավ համապատասխանության մեջ են (K հաստատունը և ոկապման տեղերի քանակը) [59,60]:

Այս ախտով, տեսական և փորձարարական տվյալները հաստատում են, որ կախված կոնցենտրացիայից, E_F-ը սպեցիֆիկությամբ է ցուցաբերում ոչ միայն երկշղթա, այնպես էլ միաշղթա ԴՆԹ-ի նկատմամբ, ընդ որում, լիզանդի մոլեկուլները և՛ երկշղթա, և՛ միաշղթա կառուցվածքների հետ կապվում են տարբեր եղանակներով:

Ներկայումս ԴՆԹ-ի տարբեր կառուցվածքների հետ ինտերկալյատոր լիզանդների փոխազդեցությունների ուսումնասիրություններում այս տվյալները համարվում են հիմնարար: Ըստ փորձարարական հետազոտությունների տվյալների՝ ԴՆԹ-ի հետ E_F-ի կապման մեխանիզմներն ունիվերսալ են և դրանց դրսևորումը գրեթե կախված չէ միջավայրի պայմաններից կամ ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունից [57,79,80]: Մյուս կողմից՝ կախված կառուցվածքային վիճակից, լիզանդ-ԴՆԹ փոխազդեցության ժամանակ կարող են չդրսևորվել կապման բոլոր եղանակները, հետևաբար, համեմատական հետազոտությունների միջոցով կարելի է պարզել ԴՆԹ-ի հետ այլ լիզանդների կապման մեխանիզմները, ինչպես նաև նրա ոչ կանոնիկ ձևերի կառուցվածքային առանձնահատկությունները: Այդ տեսանկյունից, մշակված տեսական մոդելը լավ գործիք է համարվում ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյատոր լիզանդների կոմպլեքսների առանձնահատկությունների ուսումնասիրության համար:

Չնայած այն հանգամանքին, որ լիզանդները ԴՆԹ-ի հետ կարող են կապվել տարբեր եղանակներով, որոշ լիզանդների դեպքում տվյալ մեխանիզմի դրսևորումը կախված է (իսկ որոշ լիզանդների համար կախված չէ) լուծույթի իոնական ուժից [57,79,80]: Մասնավորապես, ինտերկալյատոր ՄԿ-ի և ոչ ինտերկալյատոր Hoechst 33258 (H33258)-ի դեպքում կապման մեխանիզմի կախվածությունն է հայտնաբերվում լուծույթի իոնական ուժից, մինչդեռ E_F-ի դեպքում չի հայտնաբերվում [57,81,82]: Այս մասին վկայում են $pH \approx 7.0$ պայմաններում ԴՆԹ-ի և E_F-ի հետ դրա կոմպլեքսների ջերմաստիճանային հալման պարամետրերի հետազոտության տեսական և փորձարարական տվյալները [38,57]: Այս փաստը կարող է պայմանավորված լինել նրանով, որ ԴՆԹ-ի հետ E_F-ի կապման մեխանիզմները կախված չեն իոնների կոնցենտրացիայից: Մյուս

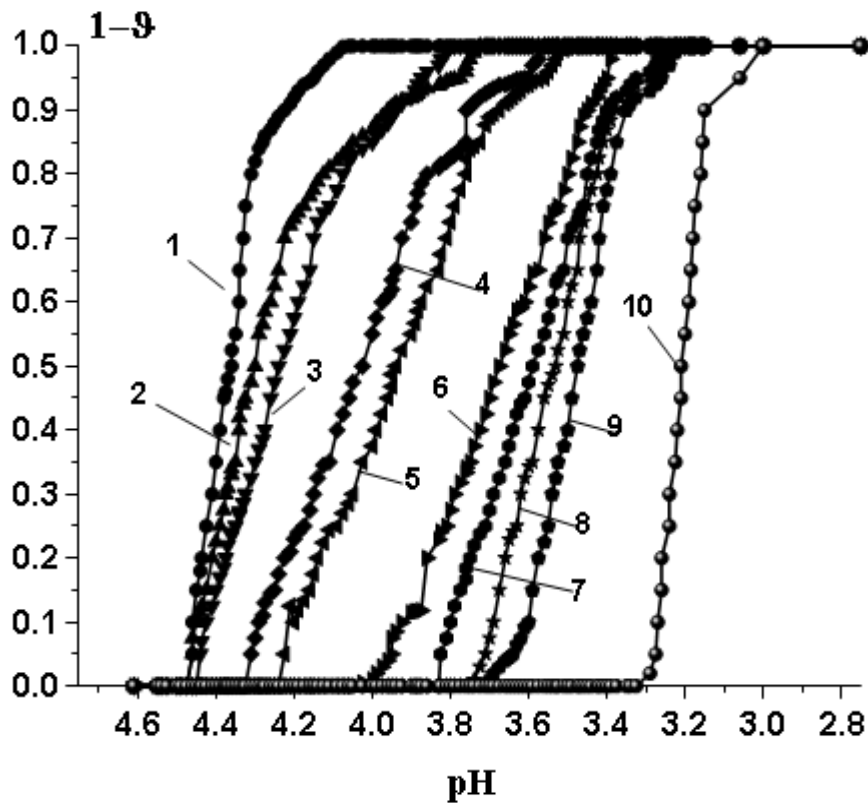
կողմից, կարևոր հարց է նաև ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունների վրա չրաժնի իոնների ազդեցությունը:

Այդ նպատակով լուծույթի 0.02 Մ իոնական ուժի պայմաններում թթվային բնափոխման մեթոդով իրականացվել են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրություններ: Նկար 11-ում բերված են ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի հետ դրա կոմպլեքսների հալման կորերը՝ $[H^+]$ կոնցենտրացիայի մեծացման և r -ի համապատասխան արժեքների դեպքում: Անցման կորերի վարքի համեմատության համար նկար 12-ում բերված են ԴՆԹ-ի (1) և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների հալման կորերը (2-10)՝ r -ի փոփոխության $0 < r \leq 0.33$ միջակայքում: Նկար 11-ից երևում է, որ կոմպլեքսների կորերը շեղված են $[H^+]$ -ի մեծ արժեքների կողմը, ընդ որում, r -ի հարաբերական փոքր արժեքների դեպքում ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կորերի թեքությունը նվազում է (2-10 կորեր, նկար 11), իսկ $r > 0.25$ -ի դեպքում կորերը նմանվում են մաքուր ԴՆԹ-ի կորին (կոր 5, նկար 11): Թթվային և ջերմաստիճանային բնափոխման միջոցով ստացված ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների դեհատուրացման կորերը բացահայտում են պարույր-կծիկ անցման պարամետրերի վրա երկու գործոնների միանման ազդեցությունը, չնայած այն հանգամանքին, որ ջրաժնի իոնները բնափոխող գործոն լինելուց բացի ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի ֆունկցիոնալ խմբերի համար հանդիսանում են նաև պրոտոնացնող գործոն: Պարույր-կծիկ անցման կորերի հիման վրա ստացվել են լիգանդի կոնցենտրացիայից δpH_m և $\delta \Delta pH$ արժեքները ($\delta pH_m = pH_0 - pH_m$, $\delta \Delta pH = \Delta pH_m - \Delta pH_0$, pH_0 -ն և pH_m -ը համապատասխանաբար ԴՆԹ-ի և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման կետերն են, ΔpH_0 -ն և ΔpH_m -ը՝ այդ անցման միջակայքի լայնությունները):

Նկար 13 (ա)-ում բերված են r -ից $\delta \Delta pH$ և δpH_m փոփոխությունների կախվածության կորերը՝ $0 \leq r \leq 0.33$ միջակայքում: Նկարից երևում է, որ r -ից $\delta \Delta pH$ -ի կախվածությունը, ինչպես և ջերմահրահրված անցման դեպքում, ունի զանգակաձև տեսք (նկար 13 ա և բ): r -ից $\delta \Delta T$ -ի կախվածության զանգակաձև տեսքը պայմանավորված է նրանով, որ լիգանդի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ($0 < r \leq 0.1$) $\delta \Delta T$ -ն աճում է, ապա նվազում է՝ անցնելով թույլ արտահայտված մաքսիմումով ($0.05 < r \leq 0.1$): Ընդ որում, $r > 0.25$ արժեքի դեպքում $\delta \Delta T$ -ն ձգտում է 0-ի, $\Delta T \approx \Delta T_0$ (տես [38]): Չալման ընթացքում լիգանդի փոքր

կոնցենտրացիաների դեպքում r -ից ΔT -ի կախվածության մեծացումը ԴՆԹ-ի բնափոխված տեղամասերից չբնափոխված տեղամասեր ԷԲ-ի մոլեկուլների վերաբաշխման հետևանք է [3,38]:

Ավելի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում ԴՆԹ-ի երկշղթա պարույրի հետ լիգանդի մոլեկուլների ինտերկալյացիոն եղանակով կապման համար նախընտրելի տեղերը հագեցնում են և անցման ընթացքում վերաբաշխումը դադարում է, ինչի արդյունքում ΔT -ն դուրս է գալիս հարթակ: Ցույց է տրված, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ կարող է կապվել կիսաինտերկալյացիոն եղանակով, որի ընթացքում լիգանդի մոլեկուլները կկապվեն ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկին [60,61]:



Նկար 11. ԴՆԹ-ի (1) և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների (2-10) պարույր-կծիկ անցման կորերը $2.5 \leq \text{pH} \leq 7.0$ միջակայքում, 0,02 մոլ իոնական ուժում, $t=25^\circ\text{C}$: r -ի արժեքները կազմել են. 1 - 0; 2 - 0.01, 3 - 0.013; 4 - 0.02; 5 - 0.025; 6 - 0.04; 7 - 0.067; 8 - 0.10; 9 - 0.20; 10 - 0.33:

Եթե ինտերկալյացիոն եղանակով ԷԲ-ի կապման դեպքում հազեցումը համապատասխանում է $n \approx 5-6$ -ի, ապա կիսաինտերկալյացիայի ժամանակ լիգանդի մեկ մոլեկուլը առավելագույնս կարող է կապվել 4 հիմքերի հետ, ինչը համապատասխանում է $r \approx 0.25$ -ին: Դրա հետևանքով անցման միջակայքի լայնությունը սկսում է նվազել՝ ձգտելով 0-ի:

Մյուս պարամետրի՝ հալման ջերմաստիճանի փոփոխության կախվածությունը աճում է $0 < r < 0.33$ միջակայքում: Դավկայում է, որ ինտերկալյացիայից և կիսաինտերկալյացիայից բացի, ԷԲ-ի դրական լիցքավորված մոլեկուլները ԴՆԹ-ի բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի հետ կապվում են նաև էլեկտրաստատիկ եղանակով, ինչը հանգեցնում է երկշղթա ԴՆԹ-ի լրացուցիչ կայունացմանը:

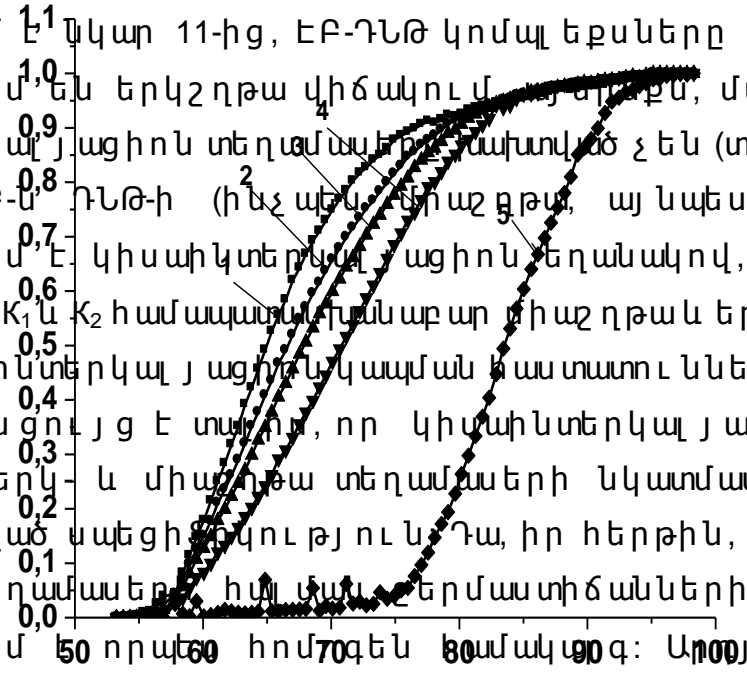
Թթվահրահրված բնափոխման ժամանակ δpH_m -ի կախվածությունն աճում է $0 < r \leq 0.1$ միջակայքում, իսկ $r > 0.1$ -ի դեպքում այդ պարամետրի աճը փոքր է: Ամենայն հավանականությամբ, բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի հետ ջրածնի իոնների կապման ընթացքում ԷԲ-ի մոլեկուլների էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունը դադարում է: Միաժամանակ, $\delta \Delta pH$ կախվածության կորի վարքը համապատասխանում է r -ից $\delta \Delta T$ -ի կախվածության կորին: Դա կարող է լինել այն բանի հետևանք, որ թթվային բնափոխման ժամանակ ԷԲ-ի ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում $\delta \Delta pH$ -ի աճը պայմանավորված է ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի վրա լիգանդի կայունացնող ազդեցությամբ, հետևաբար այդ պայմաններում ԷԲ-ի մոլեկուլները ինտերկալյացիայի են ենթարկվում: Լիգանդի կոնցենտրացիայի հետագամեծացման դեպքում $\delta \Delta pH$ -ը ևս անցնում է թույլ արտահայտված մաքսիմումով ($0,05 \leq r \leq 0,1$), ընդ որում, ջերմահրահրված անցման համեմատ այս դեպքում մաքսիմումն ի հայտ է գալիս լիգանդի հարաբերական փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում և ինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում այդ տեղամասերի հազեցումից հետո ԷԲ-ի մոլեկուլները ԴՆԹ-ի հետ սկսում են կապվել այլ եղանակով (կամ եղանակներով): Յնարավոր է, որ լիգանդի մոլեկուլների արոտնացումը, որը տեղի է ունենում

pH≈5.5 պայմաններում (ԷԲ-ի ամինաթթվային խմբերը գտնվում են ամբողջովին պրոտոնացված վիճակում (տես [55]), ԴՆԹ-ի հետ կապման ընթացքում հանգեցնում է նրան, որ կապման տեղամասերը ԷԲ-ի ինտերկալացիոն եղանակով փոխազդեցության համար դառնում

են սահմանափակ: Յարկ է նշել, որ այդ պայմաններում, ինչպես երևում է նկար 11-ից, ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսները մինչև $pH \approx 3.0$ արժեքը գտնվում են երկշղթա վիճակում, այսինքն, մակրոմոլեկուլի վրա ինտերկալյացիոն տեղամասերը միասնական չեն (տես [32,54]):

ԷԲ-ն ԴՆԹ-ի (ինչպես միաշղթա, այնպես էլ երկշղթա) հետ կապվում է կիսափնտրկալյացիոն եղանակով, որի դեպքում $K_1/K_2 \approx 2$ (որտեղ K_1 և K_2 համապատասխանաբար միաշղթա և երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կիսափնտրկալյացիոն կապման հաստատուններն են) [60,61]:

Դա ցույց է տալիս, որ կիսափնտրկալյացիայի դեպքում ԷԲ-ն ԴՆԹ-ի երկա միաշղթա տեղամասերի նկատմամբ չի ցուցաբերում ընդգծված սպեցիֆիկություն: Դա, իր հերթին, հանգեցնում է ԴՆԹ-ի այդ տեղամասերի համաստեղծանների հավասարմանը. այն հավվում որպես հոմոգեն ամպլոս: Արդյունքում, r -ից ΔT -ի կախվածության կորի վրա առաջանում է թույլ արտահայտված մաքսիմում: Միաժամանակ r -ից ΔpH -ի նախաձեռնության նոսր մոնայր նկար 12. ԴՆԹ-ի (1) և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների (1-5) շերմահրահրված ծր պարոլյր-կծիկ անցման կորերը 0,02 մոլ իոնական ուժում, - և $pH=7,0$: r -ի արժեքները կազմել են. 1 - 0; 2 - 0.02, 3 - 0.04; 4 - 0.1 և 5 -



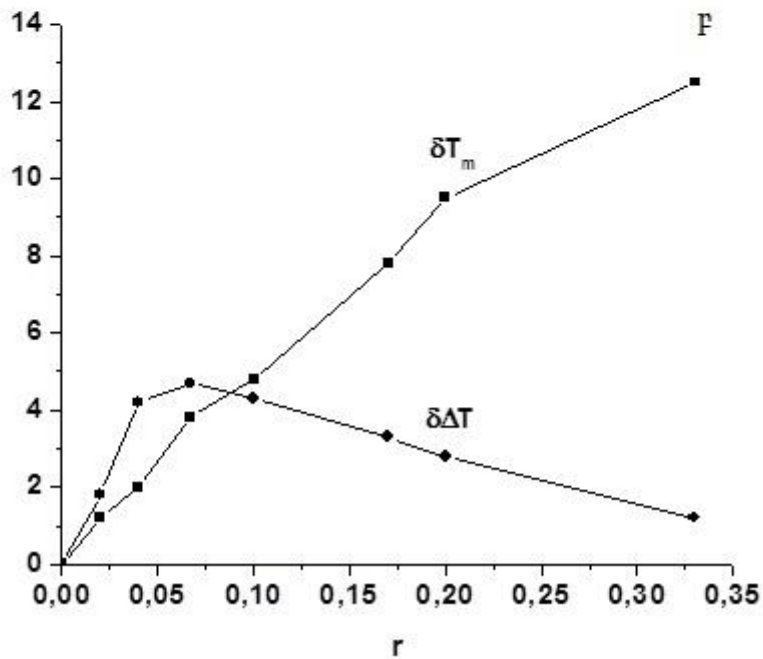
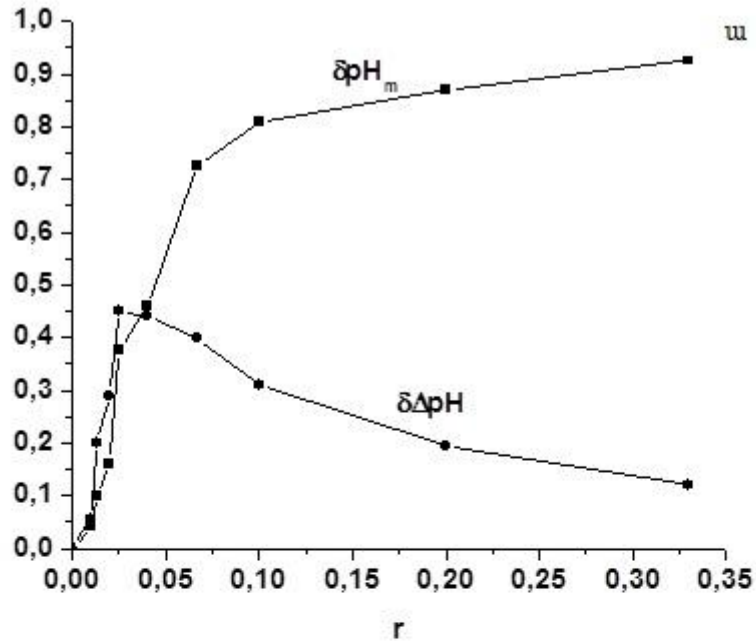
համաստեղծանային պայմանում ստորաբերությունը: ԷԲ-ի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց, երկշղթա հատվածներում կապման տեղերը հագեցնում են, որի հետևանքով լիգանդի մոլեկուլները սկսում են կապվել ԴՆԹ-ի միաշղթա հատվածների հետ, ապակայունացնելով այն և հեշտացնելով պարոլյր-կծիկ անցումը, որի հետևանքով r -ից ΔT -ի և ΔpH -ի կախվածության կորերը սկսում են նվազել և ձգտել 0-ի:

Այսպիսով, ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ԷԲ-ը կոնցենտրացիայից կախված, ԴՆԹ-ի միա- և երկշղթա կառուցվածքների հետ կապվում է տարբեր եղանակներով: Այդ տվյալներից նաև հետևում է, որ ԷԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ փոխազդում է մի քանի եղանակներով, ընդ որում, ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման եղանակները միանման են լիգանդի ինչպես պրոտոնացված, այնպես էլ չպրոտոնացված վիճակներում, քանի որ լուծույթի pH -ի չեզոք կամ թթվային արժեքներում միա- և երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման

մեխանիզմներում տարբերություններ չեն հայտնաբերվել :

Նկար 13. ա) r -ից $\delta\Delta pH$ և δpH_m կախվածության կորերը (ստացվել են նկ. 11-ում բերված կորերի հիման վրա) $0 \leq r \leq 0.35$ միջակայքում, $t=25^\circ\text{C}$, լուծույթի $2 \cdot 10^{-2}$ մոլ իոնական ուժում:

բ) r -ից δT_m և $\delta\Delta T$ կախվածության կորերը (ստացվել են նկ. 12-ում բերված կորերի հիման վրա) $t=25^\circ\text{C}$, լուծույթի $2 \cdot 10^{-2}$ մոլ իոնական ուժում:



Կոմպլեքսների փոխազդեցության սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունները

Արոմատիկ օղակներ պարունակող լիզանդների հետ ԴՆԹ-ի կապման առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունները շատ կարևոր են, քանի որ այդ միացությունները ցուցաբերում են վառ արտահայտված կենսաբանական ակտիվություն [3-11]: ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների հետազոտությունները նաև թույլ են տալիս

որոշելու ԴՆԹ-ի համապատասխան հաջորդականությունների նկատմամբ լիզանդների սպեցիֆիկությունը և բացահայտել այդ փոխազդեցությունների մեխանիզմները [57,79-82]: ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների փոխազդեցության ուսումնասիրություններում կիրառվում են տարբեր, որոնց թվում նաև, կլանման, ֆլուորեսցենտային, շրջանային դիքրոիզմի, միջուկային մագնիսական ռեզոնանսային (ՄՄՌ) սպեկտրասկոպիայի մեթոդները: Այդ մեթոդներով ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կոմպլեքսազոյացման ուսումնասիրությունը հիմնված է մակրոմոլեկուլների հետ կապման ընթացքում լիզանդների սպեկտրների բնութագրերի որակական և քանակական փոփոխությունների վրա [57-62]: Ընդ որում, շատ հաճախ համակարգում միևնույն լիզանդի փոխազդեցության տարբեր ձևերի դեպքում կոմպլեքսների սպեկտրների բնութագրական փոփոխությունները միանման չեն, բացի այդ, կապման որոշ եղանակներին համապատասխանող էֆեկտները կարող են քողարկվել այլ եղանակներին համապատասխանող փոփոխություններով: Այս տեսանկյունից, հատկապես ոչ մեծ փոփոխությունները կարող են հայտնաբերվել միայն դիֆերենցիալ մեթոդներով, քանի որ այդ դեպքում նյութի փոքր կոնցենտրացիայի պայմաններում հնարավոր կլինի գրանցել հետազոտվող նմուշի բնութագրում առկա աննշան փոփոխությունները: Այդ մեթոդներից է դիֆերենցիալ սպեկտրասկոպիան (ԴՍ) (տես [83]): Դիֆերենցիալ սպեկտրասկոպիայի միջոցով գրացվում է ոչ թե նմուշի (բացարձակ), այլ դրան ստուգիչի կլանումների տարբերությունը: ԴՍ-ի միջոցով կարելի է գրանցել ուսումնասիրվող նմուշի ֆիզիկական և ֆիզիկաքիմիական բնութագրերում առկա փոքր փոփոխությունները, որոնք կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդով հիմնականում չեն հայտնաբերվում: Ընդ որում, ԴՍ-ի մեթոդի շնորհիվ կարելի է գրանցվող պարամետրերի ճշգրտությունը մեծացնել 5-6 անգամ [83]: Նմուշների կլանման ուսումնասիրության համար առաջին անգամ դիֆերենցիալ մեթոդը կիրառել են Կորտյումը և Միլլիկենը, սակայն մեթոդի տեսական հիմնավորումը տրվել է Յիսկիի և Բաստիանիի կողմից (տես [83]): Դիֆերենցիալ չափումների ընթացքում նմուշի կլանումը գրանցվում է ստուգիչի նկատմամբ, որն ունի ոչ գրոյական կլանում, իսկ երբ ստուգիչի կլանումը

հավասար է 0-ի՝ դիֆերենցիալ մեթոդը վերածվում է կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդի (տես [83]):

Հարկ է նշել, որ որոշ դեպքերում ինտեգրալ կորերը, որոնք նկարագրում են համապատասխան ֆիզիկական պրոցեսները, ոչ միշտ են բավարար չափով տեղեկատվական լինում: Մասնավորապես՝ ԷԲ-ը, լինելով դասական ինտերկալյատոր, ԴՆԹ-ի հետ կապվում է նաև կիսահնտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով և հաճախ կիսահնտերկալյացիոն եղանակը չի հայտնաբերվում, քանի որ քողարկվում է ինտերկալյացիոն եղանակով: Յետևաբար, կապման այդ եղանակի հայտնաբերման համար անհրաժեշտ է կիրառել հետազոտման անուղղակի մեթոդներ [57]: Ներկայացված խնդրի հնարավոր լուծում կարող է լինել ԴՆԹ-ի հետ մեկից ավելի եղանակներով կապվող լիգանդների կոմպլեքսների ուսումնասիրման դիֆերենցիալ մոտեցումը: Ինտեգրալ կորերի դիֆերենցման համար կարելի է կիրառել տարբեր մոտեցումներ՝ թվային կամ ուղղակի, եթե վերջինս հնարավոր է իրականացնել փորձարարական ճանապարհով:

3.2.1. ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյատորներ ԷԲ-ի և ՄԿ-ի կոմպլեքսների սպեկտրների առանձնահատկությունները

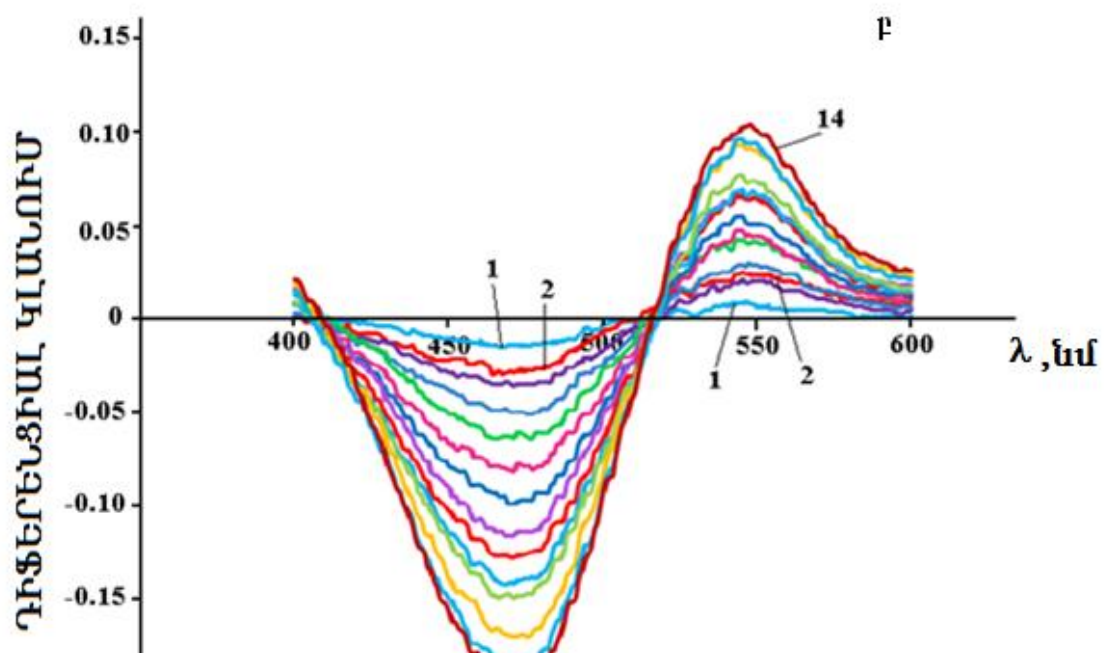
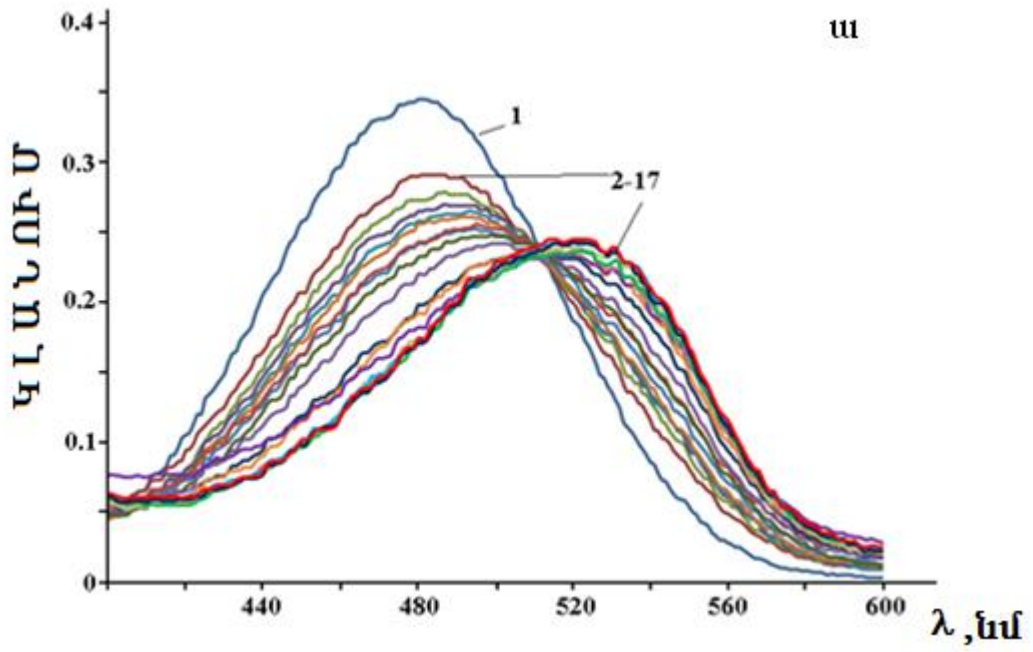
Սպեկտրաֆոտոմետրիկ մեթոդով ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյատորների փոխազդեցության ուսումնասիրությունները հիմնված են կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների զգալի փոփոխությունների վրա [78-82]: Կլանման սպեկտրների քանակական վերլուծություները հիմնված է լիգանդի լրիվ ազատ, ԴՆԹ-ի հետ տվյալ կոնցենտրացիայի դեպքում կապված և վերջինիս հետ լրիվ կապված վիճակների կլանման արժեքների որոշման վրա: Ալիքի երկարության փոփոխության $400 \leq \lambda \leq 600$ նմ տիրույթում ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ $\lambda_{max}=480$ նմ պայմաններում կլանման սպեկտրների մաքսիմումները նվազում են՝ լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի աճմանը զուգընթաց և շեղվում են դեպի ավելի երկարալիք տիրույթ (նկար 14 ա): Դա պայմանավորված է նրանով, որ ԷԲ-ի ազատ և ԴՆԹ-ի հետ կապված մոլեկուլների կլանման մաքսիմումները տարբեր են: Ընդ որում, ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսների

կլանման սպեկտրներում, $\lambda=510$ նմ-ի դեպքում ի հայտ է գալիս իզոբեստիկ կետ, քանի որ այդ կետում լիգանդի ինչպես կապված, այնպես էլ ազատ մոլեկուլները ցուցաբերում են միևնույն կլանումը (նկար 14 ա): ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների այս առանձնահատկությունները պայմանավորված են ԴՆԹ-ի հարաբերական ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում լիգանդի մոլեկուլների կողմից կապման տեղերի հագեցմամբ, ինչի արդյունքում $\lambda=480$ նմ-ում դիտվում է ԷԲ-ի կլանման ինտենսիվության նվազում և շեղում դեպի երկարալիք տիրույթ:

Լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի աճմանը զուգընթաց ԷԲ-ի ավելի շատ մոլեկուլներ են անցնում կապված վիճակի և, $C_{\text{ԴՆԹ}} \gg C_{\text{ԷԲ}}$ պայմաններում, երբ ԷԲ-ի գրեթե բոլոր մոլեկուլները կապված վիճակում են, կլանման մաքսիմումները գրանցվում են միայն $\lambda=525$ նմ ալիքի երկարության տակ: ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների այս առանձնահատկությունները թույլ են տալիս իրականացնել քանակական վերլուծություն՝ լուծույթում ԷԲ-ի ազատ և կապված մոլեկուլների կոնցենտրացիաները որոշելու համար:

ԷԲ-ԴՆԹ փոխազդեցությունն ուսումնասիրվել է նաև ԴՍ մեթոդով: Նկար 14բ -ում բերված են ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրները: Ինչպես երևում է նկարից, ԴՆԹ-ի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում ($C_{\text{ԴՆԹ}} \ll C_{\text{ԷԲ}}$), $\lambda=480$ նմ ալիքի տակ գրանցվում են բացասական, իսկ 540նմ-ի տակ՝ դրական պիկեր (նշված կոնցենտրացիաների պայմաններում այդ պիկերը կլանման սպեկտրներում բացակայում են), քանի որ ԴՆԹ-ի հետ կապման ընթացքում լիգանդի ազատ մոլեկուլների ընդհանուր կոնցենտրացիան նվազում է:

Ընդ որում, միջավայրում առաջանում է նոր համակարգ. սպեկտրալ այլ բնութագրերով՝ ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսներ, որի արդյունքում դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում ի հայտ են գալիս բացասական պիկեր՝ ազատ լիգանդի կլանմանը համապատասխանող ալիքի երկարության տակ և դրական պիկեր՝ ավելի երկարալիքի տակ, որը համապատասխանում է ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների կլանմանը:



Նկար 14. ԷԲ-ի (1) և ԴՆԹ-ի հետոքակոմպլեքսների կլանման (ա) և դիֆերենցիալ կլանման (բ) սպեկտրները: 1-ին կորերը համապատասխանում են ԷԲ-ի ազատ մոլեկուլներին, 2-17 կորերը՝ կոմպլեքսների կլանման (ա), 2-14 կորերը (բ)՝ դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներին:

Լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց $\lambda=480$ նմ և $\lambda=540$ նմ ալիքների տակ համապատասխանաբար բացասական և դրական պիկերի բացարձակ արժեքները աճում են (ԷԲ-ի լուծույթի տիտրումը ադա-ցիտրատային լուծույթով՝ ԴՆԹ-ով տիտրմանը համարժեք ծավալներով, հանգեցնում է միայն սպեկտրներում պիկերի բացասական նվազմանը $\lambda=480$ նմ ալիքի տակ): ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսների դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում 510 նմ-ում առաջանում է իզոբեստիկ կետ՝ կլանման զրոյական արժեքով: Փաստացի կլանման և դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում ԷԲ-ի ազատ մոլեկուլներին համապատասխանող պիկերն առաջանում են $\lambda=480$ նմ-ում: Ընդ որում, այդ սպեկտրներում չի փոփոխվում նաև իզոբեստիկ կետի ալիքի երկարությունը: Մյուս կողմից, ԷԲ-ի լրիվ կապված մոլեկուլներին համապատասխանող կլանման պիկերն ի հայտ են գալիս $\lambda=525$ նմ-ի տակ կլանման սպեկտրներում և $\lambda=540$ նմ-ի տակ՝ դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում: Ընդ որում, տեղի է ունենում ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսներին համապատասխանող սպեկտրների նվազում և մաքսիմումների շեղում դեպի երկարալիք տիրույթ, մինչդեռ դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում մաքսիմումներն աճում են ԷԲ-ի կապված մոլեկուլների քանակի ավելացմանը զուգընթաց, սակայն դրանք չեն տեղաշարժվում դեպի երկարալիք տիրույթ: Չարկ է նաև նշել, որ ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում պիկերը $\lambda=525$ նմ-ի տակ հայտ են գալիս այն դեպքում, երբ ԷԲ-ն սկսում է կապվել ԴՆԹ-ի հետ միայն ինտերկալյացիոն եղանակով (ԷԲ/ԴՆԹ հարաբերության փոքր արժեքների դեպքում՝ $C_{\text{ԷԲ}} \ll C_{\text{ԴՆԹ}}$): Այդ պայմաններում կլանման սպեկտրներն այլևս չեն անցնում իզոբեստիկ կետով: Այս երևույթը պայմանավորված է նրանով, որ ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մեծացման արդյունքում լիգանդի՝ բոլոր եղանակներով կապված մոլեկուլները սկսում են վերաբաշխվել և կապվել ինտերկալյացիայի համար ազատ տեղերի հետ (ինտերկալյացիան հանդիսանում է ԷԲ-ի կապման հիմնական եղանակը և բնութագրվում է կապման հաստատունի մեծ արժեքով [61]): Յիմնվելով այս փաստի վրա, մենք եզրակացնում ենք, որ դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում

540 նմ-ի տակ գրանցվող մաքսիմումները համապատասխանում են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի՝ ինտերկալյացիոն մեխանիզմով կապված մոլեկուլներին: Այս եզրահանգումը հաստատվում է նաև այն փաստով, որ դիֆերենցիալ կլանման դեպքում յուրաքանչյուր սպեկտրում $\lambda=480$ նմ-ին և $\lambda=540$ նմ-ին համապատասխանող պիկերի փոփոխությունների բացարձակ արժեքները իրար հավասար չեն: Դա պայմանավորված է նրանով, որ $\lambda=480$ նմ-ում դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրների բացասական փոփոխությունը ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման ոչ միայն ինտերկալյացիոն, այլև կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակների արդյունք է [61]: Այս տվյալները համապատասխանում են գրականության տվյալներին և նույնպես կարող են հիմք հանդիսանալ ԴՆԹ-ի հետ այլ լիզանդների փոխազդեցության ուսումնասիրությունների վերլուծության համար:

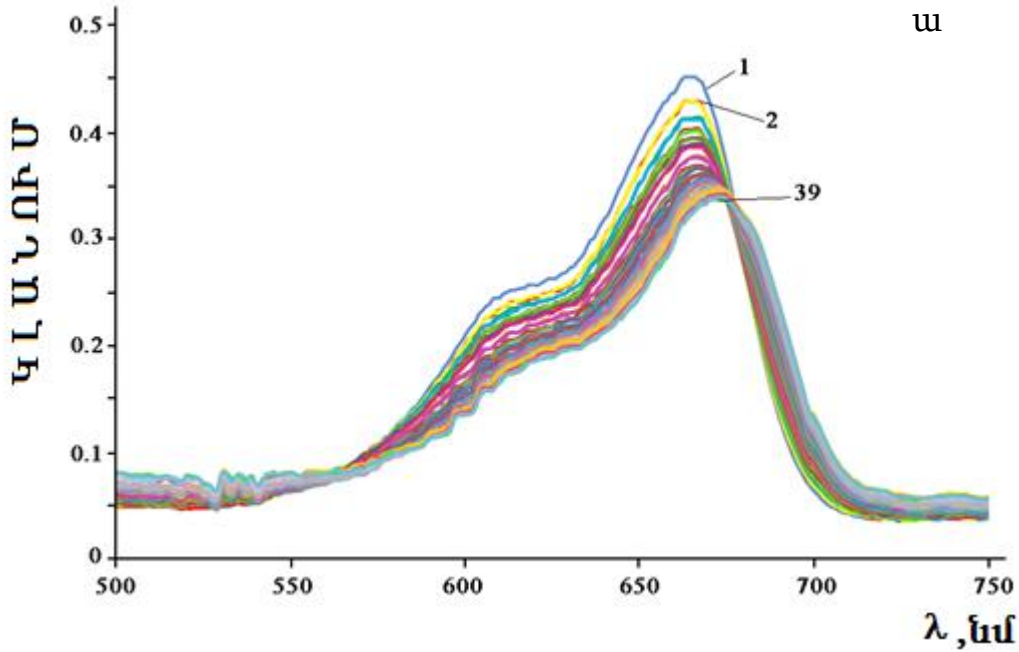
Մասնավորապես, ԴՆԹ-ի հետ մեկ այլ լիզանդի՝ ինտերկալյատոր համարվող ՄԿ-ի կապման մեխանիզմները ներկայումս ամբողջովին պարզաբանված չեն: Յետևաբար, ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների ուսումնասիրությունները և ստացված արդյունքների համեմատումը ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների համար ստացված տվյալների հետ թույլ կտան պարզաբանելու այդ լիզանդի կապման այն առանձնահատկությունները, որոնք ներկայումս էլ հանդիսանում են քննարկման առարկա: Յիմնվելով այդ փաստի վրա, մեր կողմից ստացվել են նաև ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների կլանման և դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրները, որոնք բերված են նկար 15-ում: ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսի կլանման սպեկտրները (նկար 15 ա) ստացվել են ալիքի երկարության փոփոխության $500 \leq \lambda \leq 750$ նմ տիրույթում: Տեսանելի տիրույթում ՄԿ-ի կլանման մաքսիմումը գրանցվում է 664 նմ-ի տակ, ընդ որում, ~620 նմ-ի տակ ի հայտ է գալիս ուսիկ (կոր 1): ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի մեծացումը հանգեցնում է ՄԿ-ի կլանման մաքսիմումների նվազմանը (հիպոթրոմային էֆեկտ), մինչդեռ λ_{max} -ի շեղում գրեթե տեղի չի ունենում: ԴՆԹ-ի ավելի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում, հիպոթրոմային էֆեկտի հետ մեկտեղ տեղի է ունենում նաև երկարալիք շեղում (~4-5 նմ), ինչը բնորոշ է ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդող լիզանդների

կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներին: Ինչպես երևում է բերված նկարից, ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների սպեկտրներում կարելի է առանձնացնել տեղամաս, որտեղ բոլոր կորերը գրեթե համընկնում կամ հատվում են, սակայն այդ տեղամասը չի կարելի համարել իզոբեստիկ կետ, ինչպես ԷԲ-ի դեպքում:

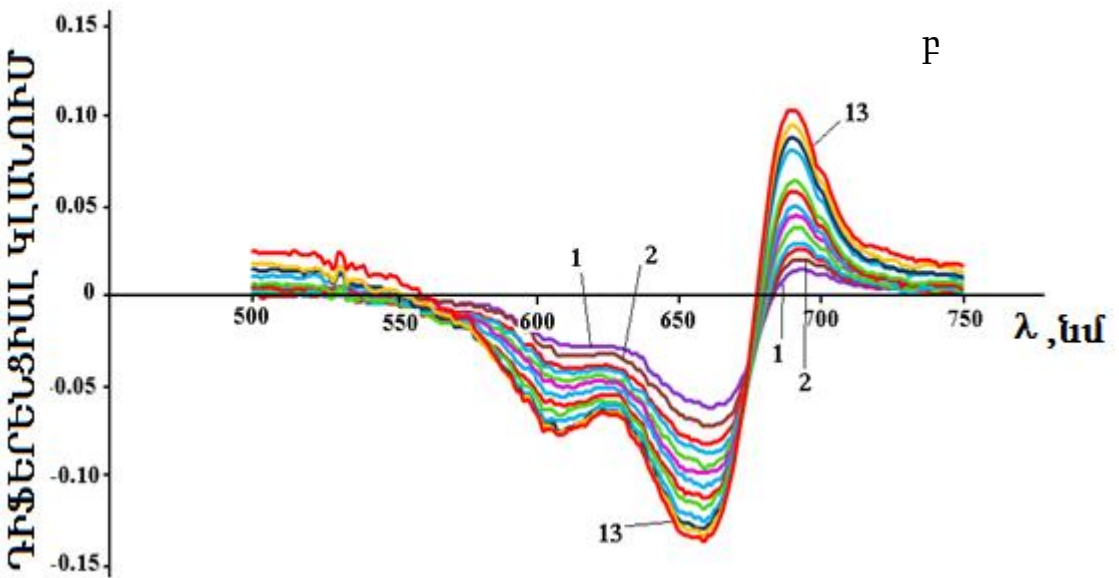
Այս փաստը ցույց է տալիս, որ ՄԿ-ի կապված և ազատ վիճակում գտնվող մոլեկուլների սպեկտրաֆոտոմետրիկ բնութագրերը միմյանցից քիչ են տարբերվում:

Նկար 15. ՄԿ-ի (1) և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների կլանման (ա) և դիֆերենցիալ կլանման (բ) սպեկտրները: 1-ին կորերը համապատասխանում են ՄԿ-ի ազատ մոլեկուլներին, 2-39 կորերը՝ կոմպլեքսների կլանման (ա), 2-13 կորերը (բ)՝ դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներին:

մաթ
հա
կա
կու
սաթ
ի
զու
($\lambda=6$
դես
փու
նկ
և
իր
աթ
հա
կու
զու
կլ
եղ
(հի
ար
[6,7
կլ



ա որևերի
րելի է
մնակով
ետ դրա
Այս
=660նմ-
սցմանը
իքները
րացման
սական
ձերված
660նմ
երը



բ դա
երը
ոնց
ճիև
երի
այս
միև
նդի
իվ)
իալ
տակ

ի հայտ եկող պիկերի բացարձակ արժեքների միջև առկա է փոքր տարբերություն: Մենք կարծում ենք, որ այդ տարբերությունը պայմանավորված է ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի կապման երկու եղանակներով [84-87]:

Հարկ է նաև նշել, որ ՄԿ-ի դեպքում (ի տարբերություն էԲ-ի), դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրներում ևս չի հայտնաբերվում իրական իզոբեստիկ կետ: Այս երևույթը, ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է նրանով, որ ՄԿ-ի արոմատիկ օղակները ամբողջությամբ չեն ներդրվում ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային

գույգերի հարթությունների միջև: Այս փաստը նաև հաստատվում է նրանով, որ ԴՆԹ-ի հետոչ ինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդող միացությունների (մասնավորապես Hoechst 33258-ի, որը տեղակայվում է ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում) դեպքում, կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում ևս չի հայտնաբերվում իզոբեստիկ կետ [15-17]: Մյուս կողմից, գրականության տվյալները հաստատում են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի ինտերկալյացիոն մեխանիզմով փոխազդեցությունը [4,5,88-93]: Յետևաբար, հիմնվելով մեր կողմից ստացված փորձարարական, ինչպես նաև գրական տվյալների վրա, կարծում ենք, որ ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրների վրա առկա դրական աիկերը կիսաինտերկալյացիոն կապման հետևանք են, մինչդեռ ԷԲ-ի դեպքում տեղի ունի լրիվ ինտերկալյացիա, որի ժամանակ լիզանդի կապված մոլեկուլների սպեկտրաֆոտոմետրիկ բնութագրերը էապես տարբերվում են ազատ մոլեկուլների բնութագրերից: Միաժամանակ, ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների սպեկտրներում ի հայտ եկող իրական իզոբեստիկ կետի առկայությունը նշանակում է, որ, ամենայն հավանականությամբ, գոյություն ունի կապման միջանկյալ վիճակ, որի դեպքում ԷԲ-ի ազատ և կապված վիճակում գտնվող մոլեկուլները ունեն նույն կլանումը: Այս վիճակին համապատասխանում են կիսաինտերկալյացիոն եղանակով միացող մոլեկուլները, որոնք, լինելով կապված, այնուամենայնիվ, ունեն որոշակի ազատություն: Այս տեսանկյունից կարելի է բացատրել իզոբեստիկ կետից սպեկտրների շեղումը ԴՆԹ-ի այն կոնցենտրացիաների դեպքում, երբ ԷԲ-ի մոլեկուլները հիմնականում կապվում են ինտերկալյացիոն եղանակով:

Հիմնվելով վերը բերված վերլուծությունների վրա կարելի է եզրակացնել, որ ՄԿ-ի և ԷԲ-ի սպեկտրաֆոտոմետրիկ բնութագրերը կախված են նրանց կապման մեխանիզմներից: Մյուս կարևոր եզրակացությունը կայանում է նրանում, որ ԴՆԹ-ի հետ տարբեր լիզանդների փոխազդեցության ուսումնասիրություններում տարբեր մեթոդների համադրումը թույլ է տալիս բացահայտելու այնպիսի առանձնահատկություններ, որոնք միայն մեկ մեթոդի դեպքում չեն կարող բավարարչափով տեղեկատվական լինել:

3.2.2. Իզոբեստիկ կետի ու սու մնասիրությունը ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում

Բազմաթիվ միացությունների կլանման սպեկտրներում ի հայտ է գալիս իզոբեստիկ կետ (ԻԿ), որը սակայն, որպես սպեկտրալ բնութագրիչ, հազվադեպ է կիրառվում տեղեկատվության քանակական կամ որակական վերլուծության համար: Մինչդեռ անկասկած է, որ տրված կոնցենտրացիաների դեպքում ԻԿ-ը հանդիսանում է մեկ միացության կլանող խմբի կամ այդպիսի միացությունների խառնուրդի որակական և քանակական հատկանիշների խորքային բնութագրիչ [94-102]: Ընդունված է համարել, որ ԻԿ արտահայտվում է այն ժամանակ, երբ լուծույթում տվյալ նյութը, որն ունի որոշակի կլանում, փոխարկվում է մեկ այլ նյութի, որի կլանումը նույնը չէ ելակետայինի համեմատ, սակայն այդ երկու ձևերի սպեկտրները հատվում են մեկ կետում, որն էլ կոչվում է իզոբեստիկ: ԻԿ արտահայտվում է նաև այն ժամանակ, երբ լուծույթում առկա են առավելագույն երկու նյութեր տարբեր սպեկտրալ հատկանիշներով, որոնք սակայն նույնպես կարող են որոշակի մեկ կամ մի քանի կետերում ունենալ միևնույն կլանումը [94-102]:

Աշխատանք [99]-ում ցույց է տրված, որ ալիքի երկարությունը, որի դեպքում ձևավորվում է ԻԿ-ը, կարող է փոխվել, երբ լուծույթում մեկ նյութը վերափոխվում է մեկ այլ նյութի, ընդ որում, տվյալ միացության շրջապատի գործոնները չեն ազդում այդ փոխարկման վրա: Ծառ հաճախ դա պայմանավորված է նրանով, որ մեկ վիճակից մյուսին անցումը կարող է տեղի ունենալ միջանկյալ կայուն ձևի առաջացմամբ կամ ելակետային նյութը միաժամանակ անցնում է միջանկյալ վիճակի և փոխարկվում է վերջնանյութի [99]: Այս փաստը հատկապես կարևոր է ԴՆԹ հետ լիգանդների կոմպլեքսների առաջացման ու սու մնասիրություններում: Այս տեսանկյունից, մեր կողմից իրականացվել է ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյատորների կոմպլեքսների սպեկտրներում ի հայտ եկող իզոբեստիկ կետի վերլուծություն:

ԴՆԹ-լիգանդ կոմպլեքսների դեպքում ԻԿ-ի առկայությունը վկայում է, որ փոխազդող նյութերի կոնցենտրացիայի

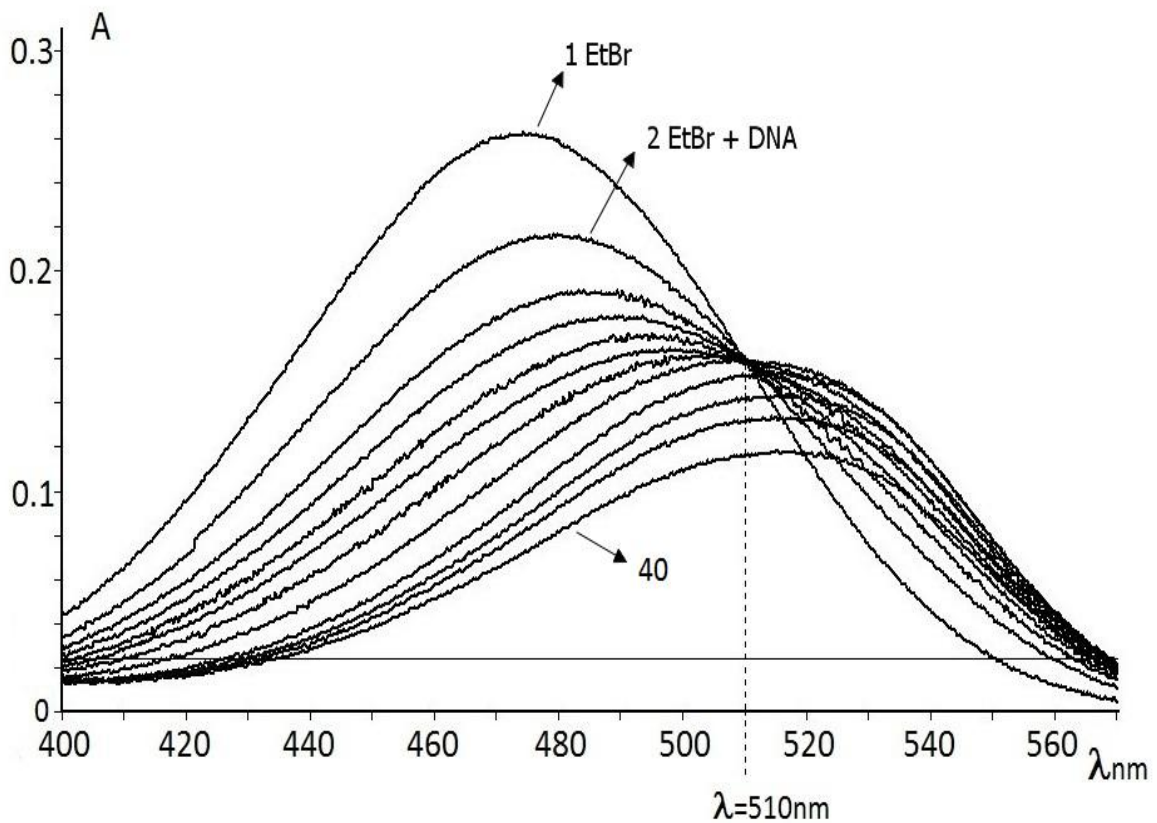
փոփոխության որոշակի միջակայքում առկա է լիգանդի մոլեկուլների երկու՝ ազատ և կապած վիճակների միջև հավասարակշռություն: ԻԿ-ի գրաֆիկական հայտնաբերման մեթոդը սովորաբար կիրառվում է այն դեպքերում, եթե լիգանդի ազատ և կապած մոլեկուլները ունեն կլանման միախառնված շերտեր [94-102]:

ԻԿ կարևորության հետևանքով տարբեր հետազոտություններում ուսումնասիրվել է այդ կետի վարքը և մշակվել են հայտնաբերման մեթոդները [94-102]: Մեր կողմից առաջարկվող մեթոդական մոտեցումը թույլ է տալիս ԻԿ միջոցով նկարագրել լիգանդի փոխազդեցությունը ԴՆԹ հետ և բացահայտել մակրոմոլեկուլների հետ լիգանդների կապման տարբեր եղանակների առկայությունը: Որպես օրինակ կիրառվել են ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները:

Նկար 16-ում բերված են ԷԲ-ի (1) և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման բնութագրական սպեկտրները (2-11), որոնք դիտարժանության համար առանձնացվել են ընդհանուր սպեկտրներից (թվով 40): ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց կլանման մաքսիմումները նվազում են և տեղաշարժվում դեպի երկարալիք տիրույթ: Բերված նկարից նաև լավ երևում է, որ ԴՆԹ/ԷԲ կոնցենտրացիոն հարաբերության որոշակի (>6) արժեքներից սկսած՝ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները շեղվում են ԻԿ-ից, որը գրանցվում է 510 նմ ալիքի տակ: ԻԿ-ի առկայությունը կլանման սպեկտրներում վկայում է, որ ԷԲ-ի մոլեկուլները լուծույթում գտնվում են առնվազն երկու, սպեկտրաֆոտոմետրիկորեն իրարից տարբերվող վիճակներում՝ կապած և ազատ: Այն փաստը, որ մեծ համարներին (ԴՆԹ-ի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում) համապատասխանող կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներն այլևս չեն անցնում ԻԿ-ով, վկայում է, որ ԴՆԹ-ում կապման տեղամասերի մեծ ավելցուկի դեպքում ԷԲ-ի մոլեկուլները այլ եղանակով են փոխազդում մակրոմոլեկուլի հետ (ինտերկալյացիոն): Այդպիսի տվյալներ են ստացված նաև այլ հետազոտողների կողմից [99]:

ԻԿ դիրքի հաշվարկը և այդ կետից սպեկտրների շեղումը պայմանավորող ԴՆԹ-ի նվազագույն կոնցենտրացիայի որոշումը հիմնվում են հետևյալ սկզբունքի վրա: Ենթադրենք առկա են N թվով A_i տիտրման սպեկտրներ, որոնց համարները ընկած են 1≤i≤N

միջակայքում (նկար 13): $i=1$ համարի սպեկտրը համապատասխանում է E^F -ի լուծույթին Γ - L թաղանթի բացակայության դեպքում: Սկսած $i=2$ -ից մինչև 40-րդ համարները համապատասխանում են Γ - L թաղանթի հետ E^F -ի կոմպլեքսներին՝ մակրոմոլեկուլի կոնցենտրացիայի աճի դեպքում: Առանձնացնենք սպեկտրների խումբ՝ $1 \leq i \leq k$, որտեղ k -ն գտնվում է $1 \leq k \leq N$ միջակայքում այդ խմբի համար ստանանք միջինացված սպեկտր:



Նկար 16. E^F -ի (1) և Γ - L - E^F կոմպլեքսների (2-ից 40-երորդը) կլանման սպեկտրները: Կլանման սպեկտրներում առկա է լավ արտահայտված իզոբեստիկ կետ:

$$\bar{A}_k(\lambda) = k^{-1} \cdot \sum_{i=1}^k A_i(\lambda) \quad (20)$$

Այնուև հետև ստանանք այդ խմբի սպեկտրների միջին քառակուսային շեղումը՝ $\sigma_k(\lambda)$ -ն, այդ միջինացված սպեկտրից.

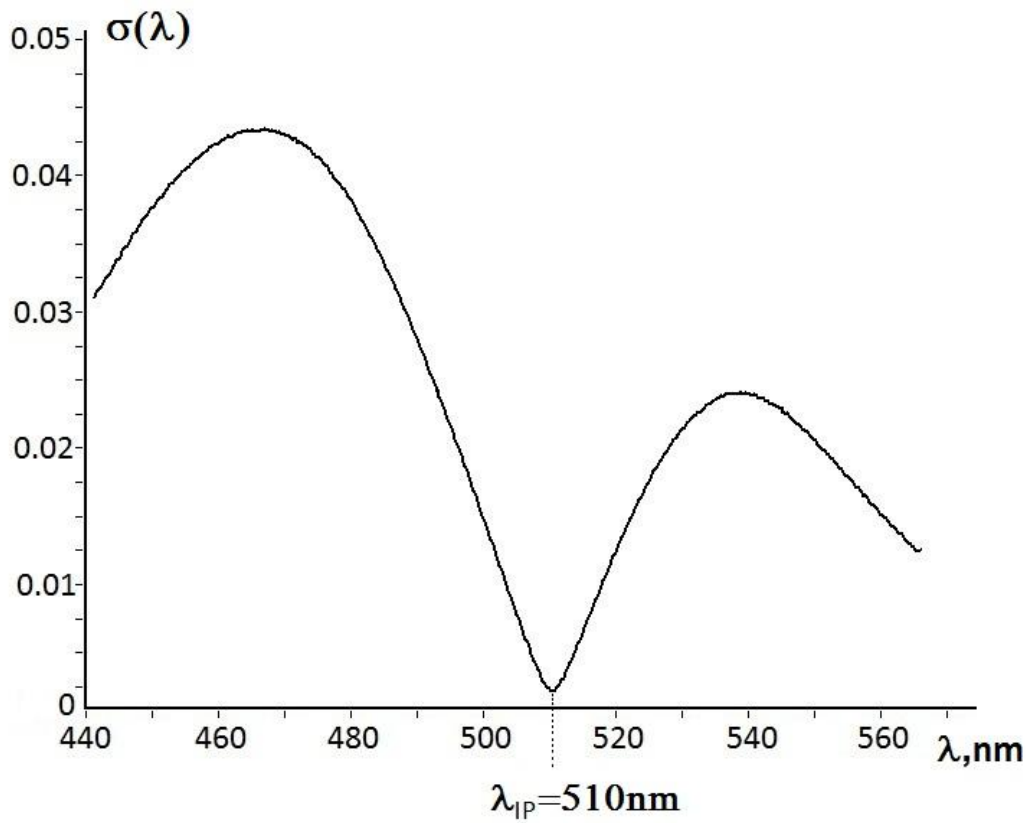
$$\sigma_k(\lambda) = \{k^{-1} \cdot \sum_{i=1}^k [A_i(\lambda) - \bar{A}_k(\lambda)]^2\}^{1/2}; \quad \sigma_1(\lambda) \equiv 0 \quad (21)$$

Ինչպես նաև $\sigma_k(\lambda)$ -ն բոլոր N թվով սպեկտրների դեպքում.

$$\sigma(\lambda) = \{N^{-1} \cdot \sum_{i=1}^N [A_i(\lambda) - \bar{A}_N(\lambda)]^2\}^{1/2} \quad (22)$$

$\sigma(\lambda)$ ֆունկցիայի միևնույնիմուսը համապատասխանում է իզոբեստիկ կետի ալիքի երկարության՝ λ_{IP} -ի արժեքին: λ_{IP} -ի ստացված արժեքի համար հաշվարկվում են $\sigma_k(\lambda_{IP})$ -ի N թվով արժեքները, երբ $k = \overline{1, N}$: Այդ կախվածությունը օգտագործվում է՝ $\sigma_k(\lambda_{IP})$ -ի նվազագույն արժեքով բնութագրվող սպեկտրների համարների միջակայքը ($k_1 \leq i \leq k_2$) որոշելու համար: Դա անհրաժեշտ է ԻԿ-ի դիրքը ստանալու, ինչպես նաև ԴՆԹ-ի այն նվազագույն կոնցենտրացիայի որոշման համար, որի դեպքում կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները սկսում են շեղվել այդ կետից: Ալիքի երկարության նից՝ λ -ից σ -ի կախվածություն կորը բերված է նկար 17-ում: Բերված նկարում ակնհայտ է լավ արտահայտված միևնույնիմուսը՝ $\lambda = 510$ նմ-ում, որը համապատասխանում է իզոբեստիկ կետին: Այդ կետի իրական գոյությունը հայտնաբերելու նպատակով ստացվել է k -ից $\sigma_k(\lambda_{IP})$ կախվածությունը (նկար 18): Այդ կախվածության վրա (1;0) կոորդինատներով կետը համապատասխանում է $\sigma_1(\lambda_{IP}) = 0$ արժեքին, որն ստացված է ըստ 1-ին սպեկտրի (նկար 16), երկրորդ կետը համապատասխանում է $\sigma_2(\lambda_{IP})$ -ին, որն ստացված է ըստ երկրորդ սպեկտրի, և այդպես՝ բոլոր (թվով 40) սպեկտրների համար որոշված են $\sigma(\lambda_{IP})$ -ի արժեքները: Առաջին մի քանի կետերի մեծ ցրումը պայմանավորված է փոքրաթիվ ընտրանքով, իսկ կետերի թվի ավելացումը (նշված կախվածության միջին հատվածում) հանգեցնում է հորիզոնական տեղամասի առաջացմանը:

Այդ տեղամասը համապատասխանում է ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների այն սպեկտրներին, որոնք անցնում են իզոբեստիկ կետով:



իջիւ

Նկատելով, որ $\sigma(\lambda)$ իմիջիցիմ փոխանակելով λ -ը λ_p -ով, հարկավոր հասնելու էր k կախի՞նքի փոփոխությանը՝ ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների $k=N=40$ թվով կլանման սպեկտրների համար:

Այդ կետերի համար որոշվել են $\sigma_{k_1, k_2}(\lambda)$ -ի արժեքները հետևյալ հավասարումներից.

$$\bar{A}_{k_1, k_2}(\lambda) = (k_2 - k_1 + 1)^{-1} \cdot \sum_{i=k_1}^{k_2} A_i(\lambda) \quad (23)$$

$$\sigma_{k_1, k_2}(\lambda) = \left\{ (k_2 - k_1 + 1)^{-1} \cdot \sum_{i=k_1}^{k_2} [A_i(\lambda) - \bar{A}_{k_1, k_2}(\lambda)]^2 \right\}^{1/2} \quad (24)$$

Չաշվարկները թույլ են տալիս ավելի ճշգրիտ ստանալ ու հստակ համապատասխանող ավիթի երկարությունը, որը համընկնում է փորձարարականորեն ստացված (նկար 14 և 16) տվյալների հետ: Նկար 18-ից նաև ստացվում են այն սպեկտրները, որոնք շեղվում են հստակ: Դրանք համապատասխանում են ԴՆԹ-ի այն կոնցենտրացիաներին, որոնց դեպքում ԷԲ-ն կապվում է միայն ինտերկալյացիոն եղանակով:

Այսպիսով, ստացված տվյալները վկայում են, որ ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների սպեկտրներում փորձարարականորեն գրանցվում է լավ արտահայտված իզոբեստիկ կետ: Ընդ որում, վերը բերված մոդելի միջոցով իրականացված վերլուծությունը հաստատում է հստակ իրական գոյությունը: Ավելին, այդ կետի դիրքը կլանման սպեկտրներում միարժեքորեն համընկնում է մաթեմատիկական վերլուծությամբ ստացված դիրքի հետ: Չափանշական է նաև այն, որ նշված մեթոդով վերլուծությունը ի հայտ է բերում, որ ԴՆԹ-ի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում կոմպլեքսների սպեկտրները շեղվում են հստակ և սպեկտրների կթվից σ -ի կախվածության կորի վրա ի հայտ են գալիս երկու տեղամասեր, որոնք համապատասխանում են ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման առնվազն երկու (կամ ավելի) եղանակների: Այդ տեղամասերը նկար 18-ում համապատասխանում են $k=1-26$ և $k>26$ արժեքներին:

3.2.3. Իզոբեստիկ կետի ճշգրտումը ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոնների կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում

ԴՆԹ-ի հետ տարբեր լիգանդների կապման մեխանիզմների պարզաբանմանը նվիրված հետազոտություններում մոտեցումներից մեկը կարող է լինել հիմնարար հանդիսացող մոդելների

կիրառումը: Այս տեսանկյունից, ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների համար ստացված արդյունքները կարող են շատ հարմար գործիք դառնալ՝ ԴՆԹ հետ այլ լիգանդների փոխազդեցության մասին լրացուցիչ տեղեկատվություն ստանալու համար: Մասնավորապես, ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ին համարժեք համարվող մեթիլեն կապուլյտի (ՄԿ) կապման մեխանիզմները դեռևս լիովին բացահայտված չեն, չնայած այն հանգամանքին, որ բազմաթիվ հետազոտություններում ընդունված է ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի փոխազդեցության ինտերկալյացիոն մեխանիզմը [88-93]: Այնուամենայնիվ, գրականության մեջ քննարկվում են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության տարբեր մեխանիզմներ: Մասնավորապես, ցույց է տրված, որ ԴՆԹ-ի AT և GC հարուստ տեղամասերի հետ այդ լիգանդը տարբեր եղանակներով է փոխազդում, ընդ որում, GC զույգից կազմված հաջորդականություններ պարունակող դեկամերի հետ ՄԿ-ը կապվում է ինտերկալյացիոն եղանակով, որն էներգետիկորեն ավելի ձեռնտու է, մինչդեռ լուծույթի մեծ իոնական ուժերում այդ լիգանդը AT հաջորդականությունների հետ փոխազդում է ակոսային կապման (ինչպես նետրոպսինը, Hoechst 33258-ը) եղանակով [15-17,81,88,89]:

Չափի առնելով այս փաստերը, ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կապման մեխանիզմները պարզաբանելու համար մեր կողմից ուսումնասիրվել են կլանման և դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրները (տես նկար 15 ա և բ): Բերված նկարից երևում է, որ ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների կլանման և դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրները մոտենում են իրար տարածության շատ փոքր հատվածում՝ $\lambda=670$ նմ-ի շրջակայքում, սակայն չեն հատվում մեկ կետում, ինչպես ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների դեպքում (տես նկար 14 ա և բ): Չարկ է նշել, որ ԴՆԹ-լիգանդ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում իզոբեստիկ կետ առաջանում է այն պատճառով, որ տեղի է ունենում այդ սպեկտրների մաքսիմումների տեղաշարժ դեպի երկարալիք տիրույթ (բառաբրումային տեղաշարժ): Այդ էֆեկտը ԷԲ-ի դեպքում կազմում է առավելագույն 40-50 նմ (նկար 14), մինչդեռ ՄԿ-ի դեպքում՝ ընդամենը 4-5 նմ:

Աշխատանք [109]-ում ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում ի հայտ եկող իզոբեստիկ կետի համար որոշված σ -ի

արժեքը հանդիսանում է բավականին ճշգրիտ բնութագրիչ, այնուամենայնիվ ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների դեպքում այն կիրառելի չէ, քանի որ որոշակի թվով սպեկտրների դեպքում (երբ էլիգանդի մոլեկուլները չեն գտնվում լրիվ կապված վիճակում) σ -ն չի ստանում հաստատուն արժեք, ուստի ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում առաջանում է կեղծ իզոբեստիկ կետ (նկար 15): Այս փաստը ճշտելու նպատակով մեր կողմից իրականացվել է ԻԿ-ի «ճշգրտության վերլուծություն» ինչպես ԷԲ-ԴՆԹ, այնպես էլ ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների համար՝ աշխատանք [102]-ում բերված մաթեմատիկական մոդելի միջոցով (մաթեմատիկական մոդելը չի բերվում):

Քննարկվում է $f(x, p_i)$ Φ ունկցիայի կախվածությունը x -ից, որտեղ x -ը փոփոխական մեծությունն է, p -ն պարամետր է, $i=1; 2; 3; \dots n$ -ը՝ սպեկտրների թիվն է: Եթե սպեկտրները հատվում են x -ի փոփոխության բավականին փոքր Δx միջակայքում ($\Delta x \rightarrow 0$), ապա այդպիսի միջակայքը ընդունվում է որպես կետ (ԻԿ): Կլանման սպեկտրների դեպքում որպես պարամետր ընդունված է կոմպլեքսների կլանումը ԻԿ-ում՝ A -ն, որպես փոփոխական՝ λ -ն: Սպեկտրների որոշակի խմբի համար հատման կետը որոշվում է ըստ.

$$\left. \frac{\partial f(x, p)}{\partial p} \right|_{x^*(p)} = 0 \quad (25)$$

Եթե այդ կետը համապատասխանում է x -ի փոփոխության փոքր միջակայքին, ապա $x^*(p)$ քիչ է կախված p -ից, եթե սպեկտրների համապատասխան խումբը հատվում է մեկ կետում՝ ապա $x^*(p)$ -ն կախված չէ p -ից:

Հստակ արտահայտված ԻԿ-ի առաջացումը $f(x, p)$ Φ ունկցիայի միջոցով հասկանալու համար պետք է ընդունել, որ իզոբեստիկ կետը սովորաբար դիտվում է p_0 պարամետրի արժեքների որոշակի շրջակայքում և այդ կետն անհետանում է տվյալ շրջակայքից հեռանալիս: Հետևաբար, ԻԿ սահմանումը կիրառվում է p -ի փոփոխության այնպիսի միջակայքում, որը աննշան է շեղված p_0 -ից:

Աշխատանք [102]-ում առաջարկված է նաև ԻԿ-ի «չափերի» որոշման մեթոդ, որը թույլ է տալիս հաշվարկելու p պարամետրի (մեր դեպքում՝ A -ի) ԻԿ-ից շեղման «բարձրությունը» և «լայնությունը»,

ինչպես նաև իզոբեստիկ կետի «կտրուկությունը» EԲ-ԴՆԹ և ՄԿ-ԴՆԹ կոմպլեքսների դեպքում: Մեր կողմից կատարված հաշվարկները ի հայտ են բերել, որ ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների դեպքում կարելի է առանձնացնել կլանման սպեկտրների որոշակի թվով խումբ, որոնք անցնում են մեկ կետով՝ ԻԿ-ով: Այլ պատկեր է ստացվել ՄԿ-ի դեպքում. ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի կոմպլեքսներին համապատասխանող որոշակի թվով կլանման սպեկտրները շեղված են AԻԿ-ից այնպես, որ իրական կետ չի առաջանում, սակայն ձևավորվում է «կեղծ» իզոբեստիկ կետ:

Այսպիսով, ստացված տվյալները հաստատում են, որ ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում, $\lambda=510$ նմ ալիքի երկարության տակ առաջանում է իրական իզոբեստիկ կետ, քանի որ այդ կետում հատվում են կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների հիմնական մասը: ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների դեպքում կլանման սպեկտրները մոտենում են միմյանց որոշակի կետի շրջակայքում, սակայն միմյանց հետ հատվում են տարբեր կետերում, որոնք ցրված են $\lambda=670$ նմ ալիքին համապատասխանող կլանման՝ A-ի շուրջը:

ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների մաքսիմումների ոչ մեծ երկարալիքային շեղումը ՄԿ-ի կլանման մաքսիմումի համեմատ և հստակ դրսևորվող ԻԿ-ի բացակայությունը կարելի է բացատրել, հիմնվելով այն փաստի վրա, որ լուծույթի 0.02 մոլ իոնական ուժի դեպքում այս լիգանդը լրիվ ինտերկալյացիայի չի ենթարկվում: Ավելի վաղ ստացված տվյալները վկայում են, որ այդ պայմաններում ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է առավելապես կիսաինտերկալյացիոն եղանակով [86,87]: Այդ փաստի ապացույց է հանդիսանում նաև այն, որ $\lambda=683$ նմ-ի տակ ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները նվազում են (տես [84,96]), մինչդեռ ԷԲ-ի դեպքում, $\lambda=590$ նմ ալիքի երկարության տակ կոմպլեքսների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունները էականորեն աճում են, ինչը պայմանավորված է ԷԲ-ի մոլեկուլների ինտերկալյացիայով ԴՆԹ-ի հիմքերի գույգերի հարթությունների մեջ [57,61]:

3.3. ԷԲ-ի փոխազդեցությունը ադենինային և թիմինային նուկլեոտիդներից կազմված հոմոպուլինուկլեոտիդների հետ

ԴՆԹ-ի գործառույթների ուսումնասիրությունները մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում, քանի որ դրանք կապված են նրա կարգավորված տարածական կառուցվածքների (կոնֆորմացիաների) հետ: Լուծույթում ԴՆԹ-ն իրենից ներկայացնում է ոչ պարբերական (ապերիոդիկ) բյուրեղ, որը կարող է կոնֆորմացիոն փոխարկումների ենթարկվել, ինչը նման է բյուրեղների փուլային անցմանը [1,3,32]: Այդ անցումների վրա էականորեն կարող է ազդել նույլ եռտիդային հաջորդականությունը, որը կարևոր դեր է կատարում լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիաների հաստատման ժամանակ: Փոփոխությունները ԴՆԹ-ի նույլ եռտիդային հաջորդականություններում կարող են շեղել տարբեր կոնֆորմացիաների միջև հավասարակշռությունը, քանի որ այդ դեպքում փոփոխվում են համակարգի հետերոգենությունը (նույլ եռտիդային գույգերի հարթություններին միջև ուղղահայաց փոխազդեցությունների էներգիան), մակրոմոլեկուլի հիդրատացման աստիճանը, լիցքի խտության բաշխումը մոլեկուլի տարբեր հատվածներում և այլն [103-108]:

Չեռաբար, կարող ենք ենթադրել, որ այդ էֆեկտները պետք է ներազդեն լուծույթում ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիոն փոխարկումների վրա, ինչն իր հերթին, կարող է հանգեցնել լիգանդների հետ ԴՆԹ-ի փոխազդեցության բնութագրերի փոփոխությունը [31,110-119]: Ուստի, նույլ եռտիդային հաջորդականությունից ԴՆԹ-ի կառուցվածքի կախվածությունը բացահայտելու համար տեղեկատվական կարող են լինել ԷԲ-ի կոմպլեքսացման համեմատական ուսումնասիրությունները այնպիսի պլինուկլեոտիդների հետ, որոնք կազմված են նույնատիպ ազոտային հիմքերով նուկլեոտիդներից, սակայն իրենցից ներկայացնում են տարբեր հաջորդականություններ: Այդպիսի հաջորդականություններ են poly(dA)-poly(dT) և poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] պլինուկլեոտիդները: Ադի փոքր կոնցենտրացիաներ պարունակող լուծույթներում (համեմատաբար մեծ հարաբերական խոնավության պայմաններում) poly(dA)-poly(dT)-ն ունի B'-ԴՆԹ-ին բնորոշ կոնֆորմացիա: Լուծույթներում այս պլինուկլեոտիդը ավելի հիդրատացված է, քան poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ն կամ ԴՆԹ-ն, ընդ որում, միակ դեպք է, երբ լուծույթներում և խոնավ

թելիկներում poly(dA)-poly(dT)-ի կառուցվածքային բնութագրերը ամբողջությամբ համընկնում են: Այս պրլինոկլեոտիդի պարույրի յուրաքանչյուր գալարում տեղակայվում է 10.1 ± 0.1 նոկլեոտիդային զույգ, ընդ որում, poly(dA)-poly(dT)-ն կառուցվածքային այլ ձևերի չի փոխարկվում [32]: Մասնավորապես, լուծույթին էթանոլ ավելացնելու արդյունքում ջրի ակտիվության փոքրացումը չի հրահրում անցում B-ձևից A-ի, ինչպես poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի կամ ԴՆԹ-ի դեպքում: Poly(dA)-poly(dT)-ին բնորոշ է ՇԴ-ի առանձնահատուկ սպեկտր, այս պրլինոկլեոտիդը չի առաջացնում նոկլեոսոմներ՝ հիստոնային սպիտակուցների հետ փոխազդելիս [32], ընդ որում, այս պրլինոկլեոտիդի փոքր ակոսը ավելի նեղ է, իսկ մոլեկուլն ընդհանուր առմամբ ունի ավելի «կոշտ» կառուցվածք, քան B-ԴՆԹ-ն:

Ի տարբերություն poly(dA)-poly(dT)-ի, poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ն լուծույթում ձեռք է բերում ավելի ճկուն կառուցվածք և իր բնութագրերով գրեթե չի տարբերվում բնական ԴՆԹ-ից, բացի այդ, poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ն հանդիսանում է AT հերթափոխվող հաջորդականություն, քանի որ դրա յուրաքանչյուր շղթաներում ադենինային և թիմինային ազոտային հիմքերով նոկլեոտիդները հաջորդում են իրար: Երկշղթա կառուցվածքի մակարդակում դա հանգեցնում է նրան, որ poly(dA)-poly(dT)-ի մոլեկուլում յուրաքանչյուր տարրական բջիջ (A-T զույգ) գտնվում է նույնատիպ տարրերի հարևանությամբ, մինչդեռ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ում յուրաքանչյուր A-T զույգ գտնվում է T-A զույգերի միջև և հակառակը: Այս հանգամանքը պայմանավորում է այդ պրլինոկլեոտիդների կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ հատկությունների տարբերության առաջացումը: Դա, իր հերթին, ամենայն հավանականությամբ, կարտացոլվի լիզանդների հետ այդ պրլինոկլեոտիդների փոխազդեցության բնութագրերի վրա:

Նոկլեոսոմների կանոնիկ ձևերի հետ լիզանդների փոխազդեցության ուսումնասիրությունները արդիական են և մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում, քանի որ ցածրամոլեկուլային միացությունները կարող են էականորեն ազդել մակրոմոլեկուլների, մասնավորապես, ԴՆԹ-ի ֆունկցիոնալ հատկությունների և կառուցվածքային փոխարկումների վրա: Այդ

տեսակետից, որոշ լիզանդներ, դրանց թվում էԲ-ը, ՊՖ-ը, ԱՆ-ը ունեն լայն կիրառություն, որը պայմանավորված է ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցությամբ, որը հրահրում է կառուցվածքային փոփոխություններ ԴՆԹ-ի պարույրում [120-127]: Բացահայտված է, որ էԲ-ը նաև միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ է կապվում մեկից ավելի եղանակներով [57-61]: ԴՆԹ-ի հետ էԲ-ի կապման առանձնահատկություններին նվիրված են մեծ թվով տեսական և փորձարարական հետազոտություններ, սակայն ոչ կանոնիկ նուկլեոսիդների հետ այդ լիզանդի փոխազդեցությունը քիչ է ուսումնասիրված [70-76]:

ԴՆԹ-ի կառուցվածքի պարզաբանումից հետո այդ մակրոմոլեկուլը դարձավ բազմաթիվ հետազոտությունների առարկա, որոնցից ի հայտ եկավ, որ բացի կանոնիկ Ուոթսոն-Կրիկյան տիպի կրկնակի պարույրներից, գոյություն ունեն նաև միատիպ նուկլեոտիդներից կազմված երկշղթա պարույրներ [110-113]: Ընդ որում, ազոտային հիմքի տիպից կախված՝ կարող են առաջանալ նաև միաշղթա կարգավորված պարույրներ: Ավելին, միատիպ նուկլեոտիդներից, որոշ դեպքերում (կախված լուծույթի իոնական ուժից, pH-ից կամ խառնուրդների առկայությունից) ձևավորվում են երկ-, եռա- կամ քառաշղթա պարույրներ [32,40-52]: Այդ տեսակետից, որոշակի հետաքրքրություն է ներկայացնում poly(dA)-ն, որի կառուցվածքը, ի տարբերություն poly(A) պոլիմերի առկայի թթվի, թթվային լուծույթներում գրեթե ուսումնասիրված չէ (տես [32]): Poly(A)-ն լուծույթում կարող է գտնվել միաշղթա կամ երկշղթա վիճակում՝ կախված pH-ից:

3.3.1. Poly(dA)-poly(dT)-ի և poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ էԲ-ի կոմպլեքսների կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները

Սինթետիկ պոլիմերային նուկլեոտիդներ poly(dA)-poly(dT)-ի և poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցությունը ուսումնասիրվել է կլանման և ֆլուորեսցենսային սպեկտրասկոպիաների մեթոդով: Չարկ է նշել, որ դրանք երկշղթա մոլեկուլներ են, որոնցից մեկն իրենից ներկայացնում է հոմոպուրին-հոմոպիրիմիդինային պոլիմերային նուկլեոտիդ, մյուսը՝ պուրին-պիրիմիդինային հերթափոխվող

հաջորդականություն: Նկար 19-ում (համապատասխանաբար աևբ) բերված են ԷԲ-ի (1) և poly(dA)-poly(dT)-ի հետ դրա կոմպլեքսների կլանման (2-17) և Φ լուորեսցեսցիայի (2-13) սպեկտրները: Նմանատիպ սպեկտրներ ստացված են նաև poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության դեպքում (ուստի բերված չեն): Բերված նկարից (19 ա) երևում է, որ ԷԲ-poly(dA)-poly(dT) կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների մաքսիմումները նվազում են և տեղաշարժվում են դեպի երկարալիք տիրույթ ԷԲ-ի սպեկտրի համեմատ (նույնը տեղ ունի նաև հորթի ուրցագեղձից անջատված ԴՆԹ-ի դեպքում): Բացի այդ, ԷԲ-poly(dA)-poly(dT) կոմպլեքսների կլանման բոլոր սպեկտրներն անցնում են իզոբեստիկ կետով, որը վկայում է, որ լուծույթում ԷԲ-ն գտնվում է սպեկտրոֆոտոմետրիկորեն իրարից տարբերվող երկու վիճակներում՝ ազատ կապված: Այս փաստը վկայում է այն մասին, որ ԷԲ-ն poly(dA)-poly(dT)-ի հետ ևս փոխազդում է ինտերկալյացիոն եղանակով:

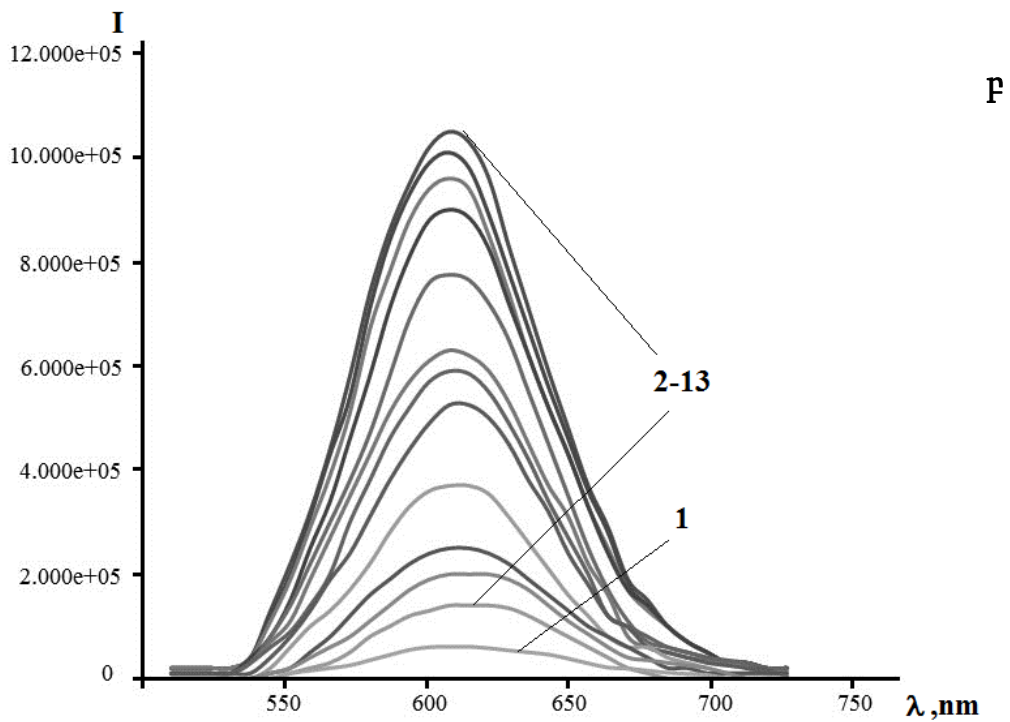
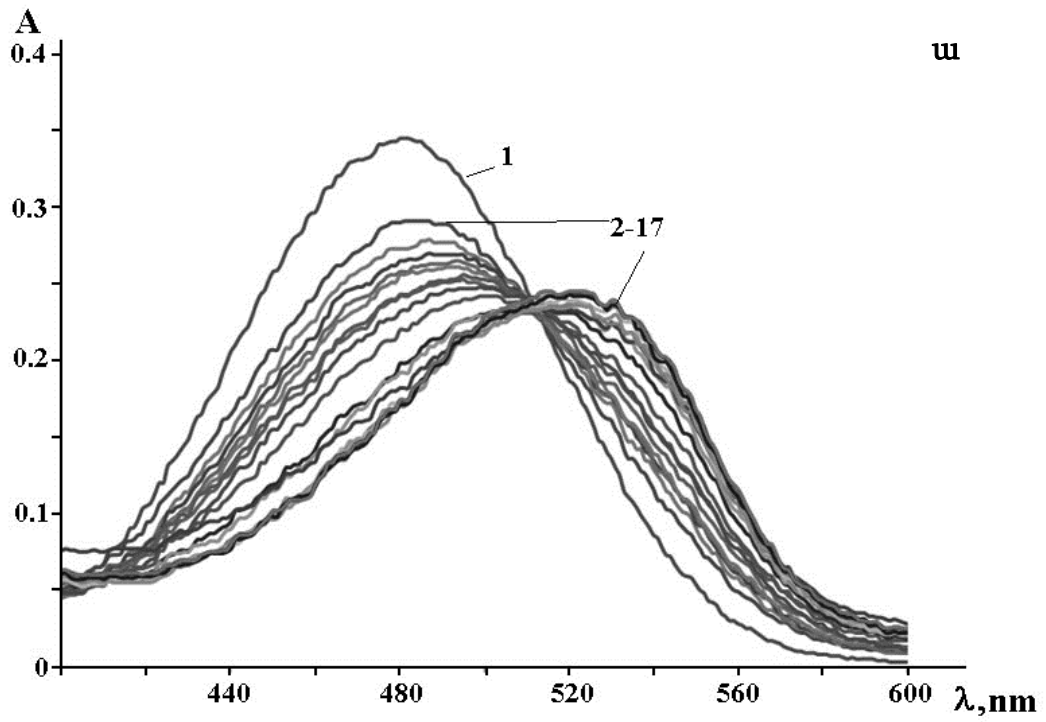
Նկար 19 բ-ից երևում է, որ poly(dA)-poly(dT)-ի հետ փոխազդեցության արդյունքում ԷԲ-ի Φ լուորեսցեսցիայի ինտենսիվությունը աճում է 40-50 անգամ՝ լիգանդի ազատ մոլեկուլների Φ լուորեսցեսցիայի համեմատ: Դապայմանավորված է նրանով, որ լիգանդի մոլեկուլները ներդրվում են նույն կլեոտիդային զույգերի հարթությունների միջև և դառնում են անմատչելի մարիչի (տվյալ դեպքում ջրի և թթվածնի լուծված մոլեկուլների) համար [31,57,77, 119]:

Poly(dA)-poly(dT)-ի և poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կլանման և Φ լուորեսցեսցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացվել են r/C_f և r կոորդինատների (Սկետչ արդյան կոորդինատներ) արժեքները և կառուցվել են պոլիհեոկլեոտիդների հետ այդ լիգանդի կապման կորերը, որոնք բերված են նկար 20-ում: Poly(dA)-poly(dT)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը կոոպերատիվ է (նկար 20 ա), մինչդեռ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի դեպքում կոոպերատիվություն չի դրսևորվում (նկար 20 բ): Ավելի ինչ, այս պոլիհեոկլեոտիդի հետ ԷԲ-ի կապման կորերը համընկնում են ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի կապման կորերի հետ [31,57]:

Այս փաստը վկայում է այն մասին, որ poly(dA)-poly(dT)-ի և poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի կառուցվածքները զգալիորեն տարբերվում են

իրարից: Ինչպես երևում է նկար 20 բ-ից, կոր 1-ը, որը ստացված է $\text{E}^{\text{F-poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների հիման վրա, ուղղագիծ է, մինչդեռ այդ կոմպլեքսների FL ու որոշ ցենցիայի սպեկտրների հիման վրա ստացված կապման կորը ուղղագիծ է:

Չարկ է նշել, որ այս դեպքում ևս 1-ին և 2-րդ կորերը տարբերվում են իրարից: Այդ կորերի տարբերության միջոցով ստացվել է կոր 3-ը, որը $r \approx 0.15$ կետում հատվում է կոր 1-ի հետ: Ցույց է տրված, որ բացի ուժեղ, հետևում սարձակող (ինտերկալյացիոն) տիպի կոմպլեքսից, E^{F} -ը G^{N} -ի հետ առաջացնում է նաև ուժեղ, հետ չլուսարձակող տիպի կոմպլեքս, որը համապատասխանում է կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապմանը [62,65]: Չետևաբար, ստացված տվյալների համապատասխանությունը վկայում է, որ $\text{poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]}$ -ի հետ E^{F} -ը նույնպես կապվում է ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն, ինչպես նաև թույլ, էլեկտրաստատիկ եղանակներով:

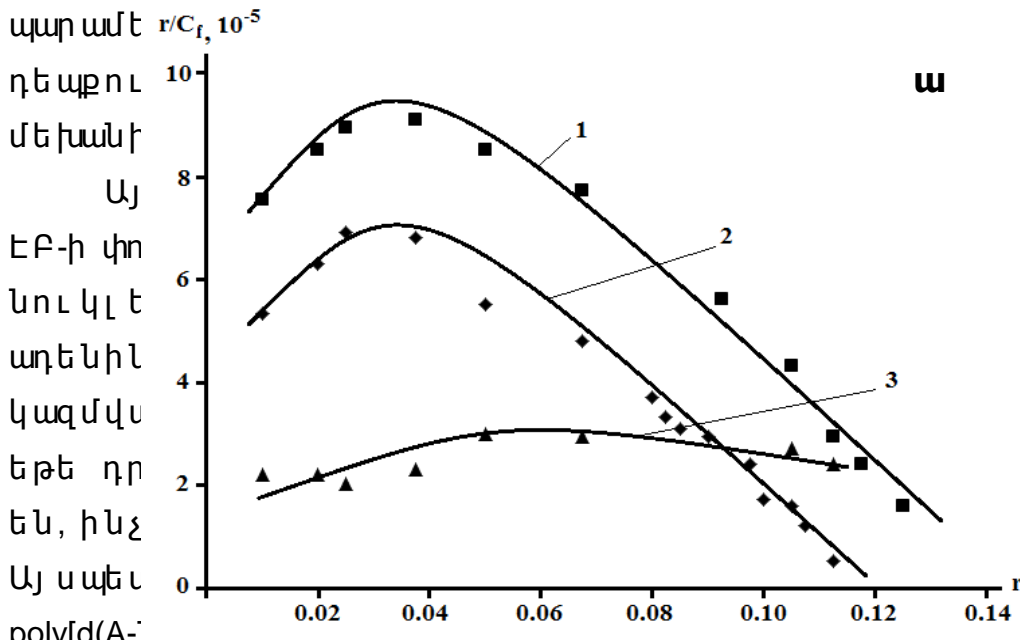


Նկար 19. ա. ԷԲ-ի (1) և ԷԲ-poly(dA)-poly(dT) կոմպլեքսների (2-17) կլանման սպեկտրները; բ. ԷԲ-ի (1) և ԷԲ-poly(dA)-poly(dT) կոմպլեքսների (2-13) ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները:

Այս փաստն, իր հերթին, ի հայտ է բերում, որ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի կառուցվածքը գրեթե չի տարբերվում բնական ԴՆԹ-ի կառուցվածքից: Նշված պոլիմերների հետ էՖ-ի կապման կորերից որոշվել են կապման հաստատունի՝ K -ի և լիգանդի կապված մեկ մոլեկուլին համապատասխանող նուկլեոտիդների թվի՝ n -ի արժեքները (15)-(17) հավասարումների միջոցով: Ստացված տվյալներից հայտնաբերվել է, որ poly(dA)-poly(dT)-ի հետ էՖ-ի ինտերկալյացիոն եղանակով կապման դեպքում $K_1 \approx 10 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_1 \approx 4,5-5$, թույլ եղանակով կապման դեպքում $K_2 \approx 3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_2 \approx 2$, մինչդեռ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ կապման դեպքում $K_1^{\$} \approx 1,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (ինտերկալյացիոն եղանակ, որի դեպքում գրանցվում է \$-նուորեսցենցիա), $n_1 \approx 5$, $K_1^{4L} \approx 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (կապման ուժեղ եղանակ, որը ստացված է կլանման սպեկտրների հիման վրա), $n_1 \approx 4-4,5$, $K_2^{\$} \approx 5,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (կապման ուժեղ եղանակ, որի դեպքում \$-նուորեսցենցիա չի գրանցվում), $n_2 \approx 3$: Քանի որ poly(dA)-poly(dT)-ի հիդրատացման աստիճանն ավելի մեծ է, դա հանգեցնում է նրան, որ էՖ-ի մոլեկուլների ինտերկալյացիան այդ պոլիմերների հիմքերի զույգերի հարթության մեջ դժվարանում է, քանի որ դրա համար անհրաժեշտ է, որպեսզի հիմքերի զույգերը հեռանան իրարից և առաջանա ինտերկալյացիոն խռոչ: Սակայն, երբ լիգանդի մոլեկուլը ներդրվում է այդ խռոչի մեջ և ստեղծվում է կապեր է առաջացնում հիմքերի զույգերի հետ, ամենայն հավանականությամբ, տեղի է ունենում հիդրատային թաղանթի խախտում, ինչպես նաև պարույրի հետ ուղորդում: Արդյունքում պոլիմերների կառուցվածքը փոփոխվում է և լիգանդի մյուս մոլեկուլների համար ինտերկալյացիան հեշտանում է: Poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ն ավելի քիչ է հիդրատացված և դրա կառուցվածքը գրեթե չի տարբերվում բնական ԴՆԹ-ի կառուցվածքից, ինչը հանգեցնում է նրան, որ էՖ-ն այս պոլիմերների հետ փոխազդում է ոչ կոոպերատիվորեն:

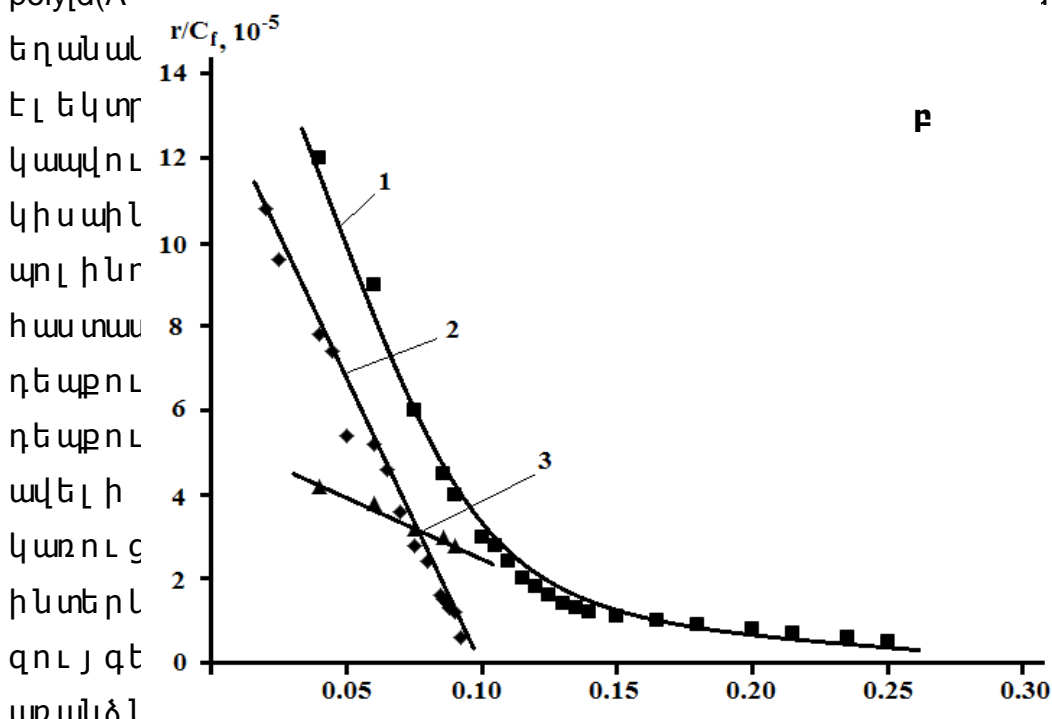
Հատկանշական է, որ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ էՖ-ի փոխազդեցության երկրորդ եղանակին համապատասխանող կապման հաստատունի արժեքը ևս գրեթե երկու անգամ մեծ է, քան poly(dA)-poly(dT)-ի հետ այդ եղանակով կապման դեպքում:

Բացի այդ, ստացված տվյալները վկայում են, որ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ E_F-ն կապվում է ևս մեկ, ավելի թույլ եղանակով, որին համապատասխանող կապման



ա

պես և ԴՆԹ-ի
 ի կտրաստատիկ
 որ ԴՆԹ-ի հետ
 շերտի տիպից և
 խնամակրապես,
 եռտիղներին
 ուցվածքներ,
 յերը տարբեր
 լան բնույթը:
 որ երկշղթա
 վազն երեք



բ

լից և
 լիգանդը
 լից և
 երկու
 կապման
 A)-poly(dT)-ի
 poly[d(A-T)]-ի
 A)-poly(dT)-ն
 լի կոշտ
 ացնում է
 հիմքերի
 մյուս
 հետ էԲ-ի

Լկար 20, ա - poly(dA)-poly(dT)-ի հետ էԲ-ի կապման կորտերը, բ -
 poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ էԲ-ի կապման կորտերը, $\mu=0.02$ M,
 հայ տնաբերվում: Այս ուղանալից, այս տվյալները չեն բացառում
 այդ մեխանիզմի գոյությունը:
 (կոր 1) և 2-ի կորտերը ստացվել են կոմպլեքսների կլանման
 հայ տնաբերվել է սառնակ, որ poly(dA)-poly(dT)-ի հետ էԲ-ի
 վրա: 3-րդ կորտերը ստացված են 1-ին և 2-րդ կորտերի
 փոխադրեցում ունի կոմպլեքսներ, որը, որի շնորհիվ հետագայում
 տարբերությամբ միջոցով:
 ունենալ կարևոր կենսաբանական նշանակություն, մասնավորապես,
 նպաստել բջջում ԴՆԹ-ի գործառույթների ավելի նուրբ
 մոդուլացմանը:

3.3.2. Poly(A)-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները չեզոք և թթվային պայմաններում

Ինչպես ցույց է տրված տեսականորեն և փորձարարականորեն, էԲ-ը ԴՆԹ-ի հետ փոխազդում է բազմաթիվ եղանակներով [3,8,57,124]: Ընդ որում, այդ եղանակները ունիվերսալ են և գործնականում միշտ դրսևորվում են՝ միջավայրի տվյալ գործոնից (լուծույթի իոնական ուժ, pH) կամ ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունից անկախ [79,80]: Յիմք ընդունելով այս փաստը, մեր կողմից ուսումնասիրվել է նաև poly(dA)-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցությունը: pH-ի տարբեր արժեքների պայմաններում poly(dA)-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցությունը կարող է տեղեկատվական լինել՝ այդ պրինուկլեոտիդի կառուցվածքի առանձնահատկությունները գնահատելու դեպքում: Այդ նպատակով մեր կողմից իրականացվել է poly(dA)-ի հետ էԲ-ի կապման ուսումնասիրությունն սպեկտրաֆոտոմետրիկ տիտրման մեթոդով՝ լուծույթի 0,02 մոլ իոնական ուժի և $pH \approx 7,0$, $pH \approx 5,5$; $pH \approx 3,5$, $pH \approx 2,5$ պայմաններում: Յատկանշական է, որ poly(dA)-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցության դեպքում ստացված սպեկտրները նման են ԴՆԹ-էԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներին (ուստի չեն բերվում): էԲ-poly(dA) կոմպլեքսների սպեկտրները $pH \approx 3,5$ -ում նվազել են էԲ-ի սպեկտրի համեմատ և տեղաշարժվել են դեպի երկարալիք տիրույթ, ինչպես նաև, կլանման սպեկտրներում ի հայտ է եկել իզոբեստիկ կետ $\lambda \approx 510$ նմ-ի տակ: Փաստացի, էԲ-poly(dA) կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները նույնպիսի վարք են դրսևորել, ինչպես չեզոք pH-ում երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցության դեպքում:

էԲ-poly(dA) կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները $pH \approx 7,0$ -ում, ենթարկվելով նմանատիպ փոփոխության, այնուամենայնիվ տարբերվում են, քանի որ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների մաքսիմումները ավելի փոքր չափով են նվազել, քան $pH \approx 3,5$ -ում, ինչպես նաև, երկարալիքային շեղումը նույնպես մեծ չէ, ի տարբերություն երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ էԲ-ի փոխազդեցության դեպքում, իսկ իզոբեստիկ կետը գրանցվել է $\lambda \approx 500$

Նմ-ի տակ: Չարկ է նշել նաև, որ այս փոփոխությունները համարժեք են միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների համար ստացված արդյունքներին (տես [31,57]): ԷԲ-poly(dA) կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները ստացվել են նաև $pH \approx 5,5$ և $pH \approx 2,5$ պայմաններում, ընդ որում, $pH \approx 5,5$ -ում կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները միանգամայն համընկել են $pH \approx 7,0$ -ում ստացված սպեկտրների հետ, մինչդեռ $pH \approx 2,5$ -ում սպեկտրները գրեթե չեն փոփոխվել, ինչը վկայում է, որ այդ pH -ում ԷԲ-ը գրեթե չի կապվում միաշղթա poly(dA)-ի հետ:

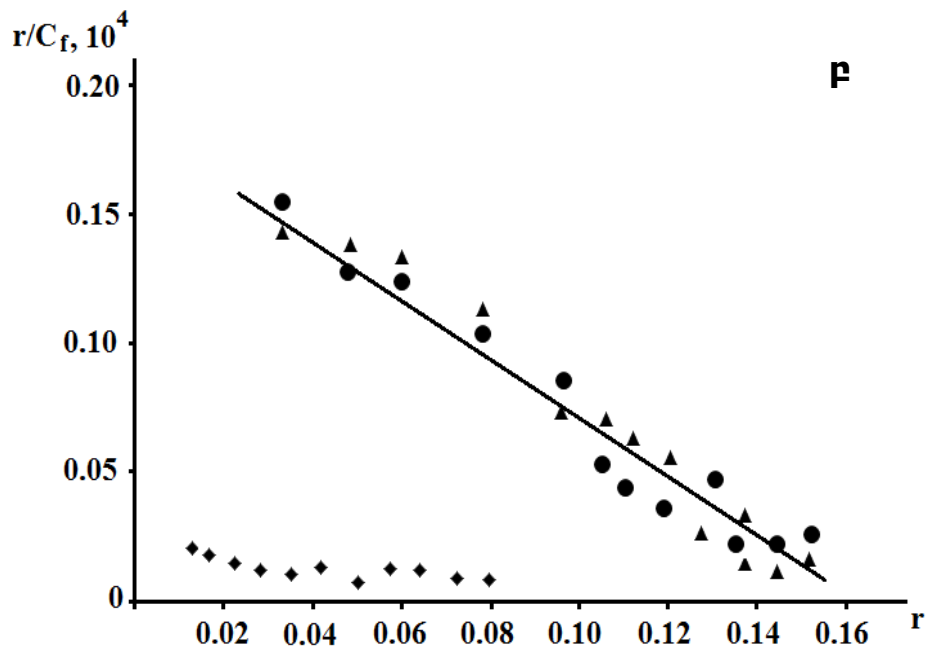
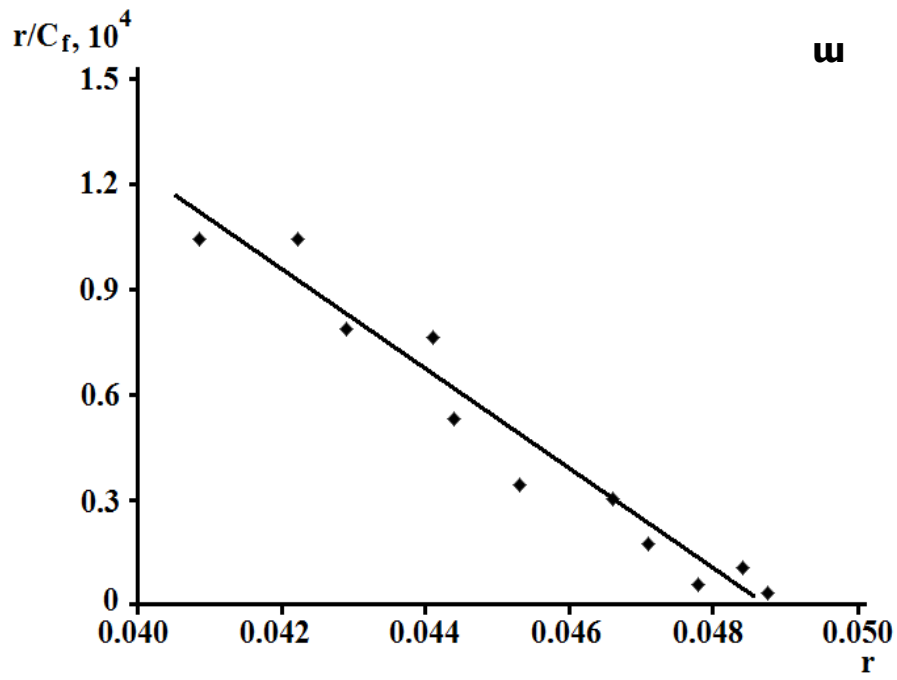
Կլանման սպեկտրների հիման վրա ստացվել են poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի կապման կորերը նշված pH -երում: Նկար 21 ա-ում բերված է poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի կապման կորը $pH \approx 3,5$ -ում, բ-ում՝ համապատասխան կորերը՝ $pH \approx 7,0$; $pH \approx 5,5$ և $pH \approx 2,5$ պայմաններում, ընդ որում, $pH \approx 7,0$ -ում և $pH \approx 5,5$ -ում փորձարարական կետերը համընկել են միմյանց հետ: Բերված նկարից երևում է, որ $pH \approx 3,5$ պայմաններում ստացված կապման կորի թեքությունը զգալիորեն մեծ է pH -ի մյուս արժեքների դեպքում ստացված կորերի թեքության համեմատ: Ավելի ին, $pH \approx 2,5$ -ում այդ կորն ունի գրեթե զրոյական թեքություն: Ուժեղ թթվային պայմաններում և պոլիմերի կոնտրոլի, և լիգանդի մոլեկուլները գտնվում են լրիվ արոտնացված վիճակում, ուստի միաշղթա poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը դառնում է ջերմադինամիկորեն ոչ ձեռնտու:

Չեզոք՝ $pH \approx 7,0$ և չափավոր թթվային՝ $pH \approx 5,5$ պայմաններում poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը ավելի «թույլ» է, քան $pH \approx 3,5$ -ում: Այդ մասին են վկայում կապման հաստատունի՝ K -ի արժեքները, որոնք որոշվել են կապման կորերից, ըստ (17)-ի: Մասնավորապես, $pH \approx 3,5$ -ում $K = 9.2 \cdot 10^5 M^{-1}$, $pH \approx 7,0$ -ում և $pH \approx 5,5$ -ում՝ $K = 8.6 \cdot 10^4 M^{-1}$: Ակնհայտ է, որ $pH \approx 3,5$ -ում poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի կապման հաստատունի արժեքը մեկ կարգով մեծ է, քան $pH \approx 7,0$ -ում և $pH \approx 5,5$ -ում: Ավելի ին, $pH \approx 3,5$ -ում $n \approx 10,5-11,0$, ինչը զգալիորեն ավելի մեծ է, քան $pH \approx 7,0$ -ում և $pH \approx 5,5$ -ում, քանի որ չեզոք և չափավոր թթվային պայմաններում $n \approx 3,5-4,0$: Չարկ է նաև նշել, որ $pH \approx 3,5$ պայմաններում n -ի արժեքը ավելի մեծ է, քան չեզոք պայմաններում երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի կապման դեպքում ($n \approx 5-6$) (տես [57]):

Յայտնի է, որ $pH < 4,0$ պայմաններում պոլիռիբոադենիլային թթուներն՝ poly(A)-ն, միաշղթա վիճակից անցնում է երկշղթա վիճակի, քանի որ ադենիլային հիմքերի պրոտոնացման արդյունքում դրանք զույգվում են ջրածնական կապերի հաշվին և առաջանում է poly(AH⁺)-poly(AH⁺) ոչ կանոնիկ երկշղթա պարույր [32]: Ի տարբերություն poly(A)-ի՝ թթվային պայմաններում poly(dA)-ի կառուցվածքը քիչ է ուսումնասիրված, սակայն չի կարելի բացառել, որ վերջինս նույնպես կարող է անցնել երկշղթա վիճակի՝ ադենիլային հիմքերի պրոտոնացման և դրանց միջև ջրածնական կապերի առաջացման շնորհիվ: Յիմնվելով այս հանգամանքի վրա՝ մենք կարծում ենք, որ poly(dA)-ի հետ էԲ-ի փոխազդեցության K-ի և n-ի արժեքները, չնայած տարբերվում են չեզոք պայմաններում երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ էԲ-ի կապման պարամետրերի արժեքներից, սակայն համապատասխանում են ինտերկալյացիոն եղանակով կապմանը՝ $pH \approx 3,5$ -ում:

Այդ մասին են վկայում նաև n-ի բավականին մեծ արժեքները, ինչը նշանակում է, որ poly(dA)-ի վրա էԲ-ի ինտերկալյացիոն եղանակով կապման տեղամասերը սահմանափակ են: Այն փաստը, որ poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺)-ի հետ էԲ-ի ինտերկալյացիոն եղանակով կապման հաստատունի՝ K-ի արժեքը տարբերվում է երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ էԲ-ի, այդ եղանակով կապման հաստատունի արժեքից, հավանաբար պայմանավորված է նրանով, որ պրոտոնացումը հանգեցնում է poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺) ընդհանուր էլեկտրաբացասական լիցքի մեծության նվազմանը, որի հետևանքով այդ ոչ կանոնիկ պարույրը ԴՆԹ-ի համեմատ ձեռք է բերում ավելի խիտ փաթեթավորում: Մյուս կողմից, էԲ-ի մոլեկուլները նույնպես պրոտոնացվում են (էԲ-ի $pK_a \approx 5,5$), որի հետևանքով լիզանդի մոլեկուլների էլեկտրադրական լիցքի խտությունը մեծանում է [54]: Այս էֆեկտների հետևանքով poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺)-ի հետ ինտերկալյացիոն եղանակով կապվելիս էլեկտրաստատիկ փոխազդեցության դերը էականորեն կաճի, որը չեզոք պայմաններում նպաստում է ինտերկալյացիային, քանի որ այս մեխանիզմով փոխազդեցությունը կազմված է երկու փուլերից: Առաջին փուլում լիզանդի դրական լիցքավորված մոլեկուլները էլեկտրաստատիկ փոխազդեցության մեջ են մտնում ԴՆԹ-ի բացասական լիցքավորված ֆոսֆատային խմբերի հետ, երկրորդ

փուլում տեղի է ունենում այդ մոլեկուլների ինտերկալացիան նույն կլեոտիդային զույգերի հարթությունների մեջ [3,14]: Այս տեսանկյունից, poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺)-ի դեպքում էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունը դժվարացնում է ինտերկալացիան, որի հետևանքով էլ K-ի արժեքն ավելի փոքր է: Բացի այդ, ցույց է տրված, որ EF-ը նախընտրելիորեն ինտերկալացվում է պիրիմիդին-պուրին հաջորդականությունների մեջ [7]: Poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺)-ն հանդիսանում է երկշղթա պարունյր, որը կազմված է միայն պուրինային հիմքերից, որի հետևանքով էլ EF-ի մոլեկուլների համար կապման տեղերը դառնում են խիստ սահմանափակ:



Նկար 21. Երկշղթա poly(dA)-ի հետ էԲ-ի կապման կորերը pH≈3,5 (ա) և միաշղթա poly(dA)-ի հետ pH≈7,0, pH≈5,5 և pH≈2,5 (բ) պայմաններում: ● փորձարարական կետերը ստացված են pH≈7,0, ▲ կետերը՝ pH≈5,5 և ◆ կետերը՝ pH≈2,5 պայմաններում:

Չեզոք ($pH \approx 7,0$) և չափավոր թթվային ($pH \approx 5,5$) պայմաններում poly(dA)-ի հետ էԲ-ի կապման հաստատունի՝ K-ի արժեքը գրեթե մեկ կարգով փոքր է $pH \approx 3,5$ -ում ստացված արժեքի համեմատ: Դա պայմանավորված է նրանով, որ $pH \approx 7,0$ և $pH \approx 5,5$ պայմաններում գտնվում է միաշղթա վիճակում, ուստի էԲ-ի մոլեկուլները այդ պոլիմերի հետ կապվում են ոչ լրիվ ինտերկալյացիոն (կիսաինտերկալյացիոն) եղանակով, ինչպես դատելի ունի միաշղթա ԴՆԹ-ի և poly[d(A-T)]-ի դեպքում (տես [31,57]): Այս եզրահանգումը հաստատվում է նաև այն փաստով, որ միաշղթա poly(dA)-ի հետ էԲ-ի կապման պարամետրերի՝ K-ի և n-ի արժեքները լավ համընկնում են համապատասխան պարամետրերի հետ, որոնք ստացված են միաշղթա ԴՆԹ-ի և poly[d(A-T)]-ի դեպքում [31,57,60]: Ընդ որում, ինչպես երևում է նկար 21 բ-ից, $pH \approx 7,0$ և $pH \approx 5,5$ պայմաններում էԲ-ը միևնույն խնամակցությունն է ցուցաբերում poly(dA)-ի նկատմամբ՝ կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապվելիս, չնայած այն հանգամանքին, որ $pH \approx 5,5$ -ում լիգանդի մոլեկուլները գտնվում են արոտնացված վիճակում:

Այսպիսով, ստացված տվյալները ի հայտ են բերում, որ լուծույթի pH-ից կախված՝ poly(dA)-ն 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 ինտերկալյացիոն կամ կիսաինտերկալյացիոն եղանակներով՝ կախված պոլիմերի կառուցվածքից: Ստացված տվյալները նաև բացահայտում են, որ նույն կառուցվածքների հետ դասական ինտերկալյատոր էԲ-ի փոխազդեցության մեխանիզմները ունիվերսալ են և դրանց դրսևորումը կախված չէ միջավայրի պայմաններից [80]:

3.3.3. էԲ-ի փոխազդեցությունը poly(G)-ի հետ

Նույն կառուցվածքները հանդիսանում են բազմաձև մոլեկուլներ, քանի որ կարող են գտնվել ոչ միայն միաշղթա և երկշղթա, այլ և բազմաշղթա (եռա- կամ քառա-) վիճակներում [130-133]:

Այդ ոչ կանոնիկ ձևերի թվում հատուկ տեղ են զբաղեցնում քառաշղթա կառուցվածքները՝ (G)₄, որոնք սովորաբար ձևավորվում են գուանիկային նուկլեոտիդներից կազմված պոլինուկլեոտիդների դեպքում, ինչը պայմանավորված է G-ի եզակի հատկությամբ: Ցիտոզինային (C) նուկլեոտիդներով հարուստ հաջորդականությունները ևս կարող են առաջացնել քառաշղթա կառուցվածքներ, եթե C-ն պրոտոնացված է, քանի որ այդ դեպքում ցիտոզին-ցիտոզինային զույգերը կարող են ինտերկալացվել նմանատիպ զույգերի մեջ [134-145]:

Ցույց է տրված, որ գենոմում առկա են գուանիկային նուկլեոտիդներով հարուստ հաջորդականություններ, որոնք հատկապես շատ են հանդիպում գեների պրոմոտորային հատվածներում, ուստի դրանց երկրորդային կառուցվածքը կարող է ունենալ կարևոր կենսաբանական նշանակություն [146-148]:

Քառաշղթա կառուցվածքները առաջանում են գուանիկային քառյակների միջև ստեկինգ փոխազդեցությունների հաշվին, դրանք կայունանում են ՅՅ ու գստենյան տիպի ջրածնական կապերով, որոնք ձևավորվում են չորս գուանիկային իմինո խմբերի պրոտոնների միջև: Այդպիսի կազմավորման միջոցով առաջանում է գուանիկային համահարթ քառյակ՝ հակառակ շղթաների ազոտային հիմքերի լրացչական (կոմպլեմենտար) զույգերի նմանությամբ [32, 135-141]:

(G)₄-կառուցվածքները զգայուն են աղերի նկատմամբ, ընդ որում, այդ կառուցվածքները կայուն են ֆիզիոլոգիական պայմաններում: Սովորաբար, երկուսից հինգ գուանիկային քառյակներ առաջացնում են սյունակներ ստեկինգ փոխազդեցությունների շնորհիվ և լրացուցիչ կայունանում են միավալենտ կատիոններով՝ K⁺-ով և Na⁺-ով [141]:

Poly(G)₄-ի հետ լիգանդների փոխազդեցության վերաբերյալ հետազոտությունները սակավաթիվ են, ուստի մեր կողմից իրականացվել են poly(G)₄-EF կոմպլեքսների հետազոտություններ կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրասկոպիաների մեթոդներով, լուծույթի 0.11, 0.31 և 0.51 մոլ իոնական ուժերում:

EF-poly(G)₄ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների փոփոխության վարքը տեսանելի տիրույթում նման է բնական ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների փոփոխությանը,

ուստի այդ սպեկտրները բերված չեն: ԷԲ-ի լուծույթում poly(G)₄-ի կոնցենտրացիան մեծացնելիս (լուծույթում էթիդիոլմի բրոմիդի հատառուն կոնցենտրացիայի դեպքում) դիտվում է հիպոբրոմային էֆեկտ, ընդ որում, սպեկտրների մաքսիմումները նույնպես տեղաշարժվում են դեպի երկարալիք տիրույթ: Կլանման սպեկտրներում ի հայտ է գալիս նաև թվացյալ իզոբեստիկ կետ $\lambda=518$ նմ ալիքի տակ: ԷԲ-poly(G)₄ կոմպլեքսների սպեկտրների այս առանձնահատկությունը վկայում է, որ լիզանդի մոլեկուլները քառաշղթա պոլիսուկցիդի հետ կապվում են այնպիսի մեխանիզմով, ինչպես երկշղթա կամ միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ: Չատկանշական է, որ քառաշղթա poly(G)₄-ի դեպքում ևս, C_p/C_0 (որտեղ C_p -ն պոլիսուկցիդի մոլային կոնցենտրացիան է ըստ ֆոսֆատային խմբերի, C_0 -ն ԷԲ-ի լրիվ կոնցենտրացիան է լուծույթում) հարաբերության որոշակի արժեքից սկսած կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները այլևս չեն փոփոխվում, ընդ որում, դրանք շեղվում են իզոբեստիկ կետից:

Poly(G)₄-ի հետ էթիդիոլմի բրոմիդի փոխազդեցությունը ուսումնասիրվել է նաև ֆլուորեսցենսային մեթոդով: Լուծույթում poly(G)₄-ի կոնցենտրացիան մեծացնելիս տեղի է ունենում ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճ, ինչպես վերը արդեն ցույց էր տրվել ԷԲ-poly(dA)-poly(dT) կոմպլեքսների համար (այդ սպեկտրները նույնպես բերված չեն): Այնուամենայնիվ պետք է նշել, որ, ի տարբերություն երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության, քառաշղթա պոլիսուկցիդի հետ կապման արդյունքում ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճը զգալիորեն փոքր է, քան երկշղթա ԴՆԹ-ի դեպքում: Չայտնի է, որ երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ կապվելիս ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը աճում է գրեթե 30-40 անգամ [57,119]: Դա պայմանավորված է նրանով, որ ԷԲ-ի մոլեկուլները երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ կապվում են ինտերկալյացիայի մեխանիզմով, այսինքն ներդրվում են ԴՆԹ-ի հիմքերի զույգերի հարթությունների միջև և էկրանավորվում են ջրի մոլեկուլներից: Այս տվյալները վկայում են, որ poly(G)₄-ի հետ կապվելիս ԷԲ-ի մոլեկուլները լրիվ չեն ինտերկալացվում:

Նուկլեինաթթուների հետ լիզանդների կապման ջերմադինամիկ պարամետրերը կարող են հանդիսանալ այն բնութագրիչները, որոնց

միջոցով հնարավոր է պարզաբանել նույն էինաթթվի հետ տվյալ կապման մեխանիզմները: Տվյալ դեպքում որպես հիմք են հանդիսանում ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի ջերմադինամիկ պարամետրերի արժեքները, որոնք ստացված են կապման տարբեր՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ, միաշղթա ԴՆԹ-ի հետ՝ կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակների համար [57]:

Poly(G)₄-ի հետ ԷԲ-ի կոմպլեքսների կլանման և ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխության սպեկտրներից հաշվարկվել են r/C_r-ի և r-ի արժեքները, որոնց միջոցով կառուցվել են կապման կորերը, որոնք բերված են նկար 22-ում: Կապման կորի միջոցով որոշվել են K և n պարամետրերի արժեքները poly(G)₄-ԷԲ կոմպլեքսների համար երեք տարբեր ջերմաստիճաններում, տարբեր իոնական ուժերում: Ստացված արժեքները համախմբված են աղյուսակ 1-ում: Աղյուսակային տվյալներից ի հայտ է գալիս, որ ջերմաստիճանի մեծացմանը զուգընթաց կապման հաստատունի արժեքները նվազում են ոչ մեծ չափով, մինչդեռ n-ի արժեքները չեն փոփոխվում: Այս փաստը վկայում է այն մասին, որ նշված ջերմաստիճանային միջակայքում կապման տեղամասերի թիվը նույնն է, ինչն, ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է նրանով, որ poly(G)-ն այդ պայմաններում հիմնականում քառաշղթա վիճակում է:

K-ի արժեքներից, որոշվել են Գիբսի ազատ էներգիայի փոփոխության արժեքները նշված ջերմաստիճաններում ըստ.

$$\Delta G = -RT \ln K$$

որտեղ R-ը գազային ունիվերսալ հաստատունն է, T-ն բացարձակ ջերմաստիճանը: Էնթալպիայի փոփոխությունը՝ ΔS -ը, կարելի է հաշվել ըստ հետևյալ բանաձևի.

$$\Delta S = - \frac{\Delta G - \Delta H}{T}$$

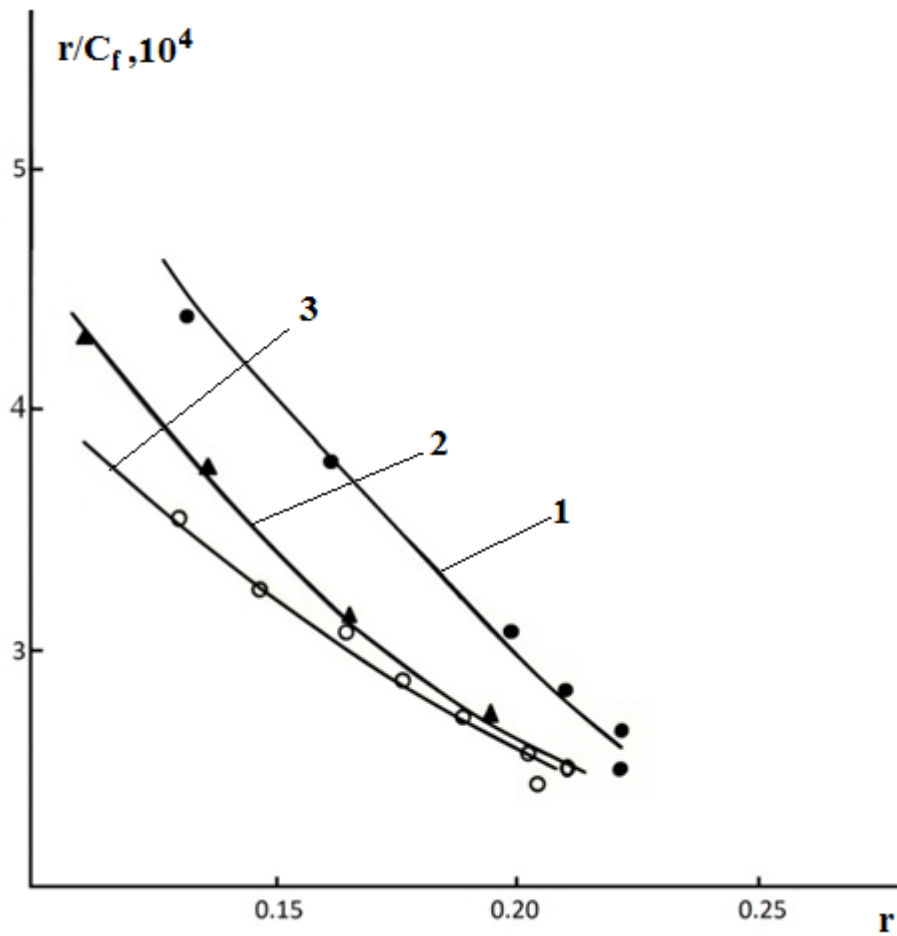
ΔH -ը որոշվել է կապման հաստատունի արժեքներից ըստ.

$$\Delta H = -R \frac{\partial \ln K}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)}$$

Եթե $\ln K$ -ի կախվածությունը $1/T$ -ից գծային է, ապա արեցիսների առանցքի հետ կորի կազմած անկյան տանգենսը ներկայացնում է $-\frac{\Delta H}{R}$ մեծությունը:

Նկար 23-ում բերված է $\ln K$ -ի կախումը $1/T$ -ից՝ poly(G)_4 -ի հետ էԲ-ի կապման համար: Այդ կախվածության միջոցով որոշվել է ΔH -ի փոփոխությունը, որը կազմել է ~ -2.2 կկալ/մոլ: ΔH -ի այս արժեքը առնվազն երեք անգամ փոքր է երկշղթանուկլեինաթթուների հետ էԲ-ի ինտերկալյացիոն մեխանիզմով փոխազդեցության դեպքում ստացվող արժեքից [149,150]: Չարկ է նշել, որ աղյուսակում ներկայացված տվյալները ստացված են poly(G)_4 -ի հետ էԲ-ի կապման այն եղանակի համար, որը երկշղթա ԴՆԹ-ի դեպքում համապատասխանում է ինտերկալյացիոն մեխանիզմին (ուժեղ եղանակ): Աղյուսակում բերված տվյալներից ակնհայտ է դառնում, որ poly(G)_4 -ի

հե
 տ
 էԲ-
 ի
 ու
 ժե
 ղ
 եղ
 ան
 ակ
 ով
 կա
 պմ
 ան
 հա
 ստ
 առ
 ու
 նը
 գր
 եթ
 ե
 եր



Նկար 22. Poly(G)₄-ի հետ էԲ-ի կապման կորերը Սկետչ արդյան կոորդինատներով, երեք ջերմաստիճաններում. 1- 293⁰Կ, 2- 298⁰Կ, 3 – 300⁰Կ:

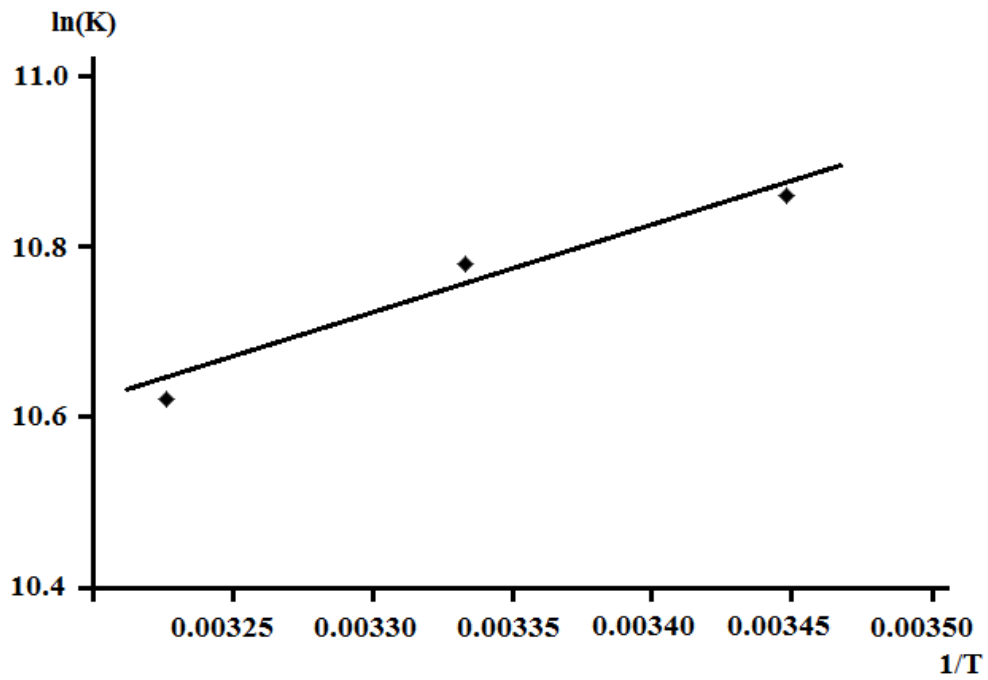
կու կարգով փոքր է, քան երկշղթա ԴՆԹ-ի դեպքում է (տես [31,57]): Ակնհայտ է, որ քառաշղթա կառույցների հետ էԲ-ի փոխազդեցությունը էականորեն տարբերվում է երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ այդ լիգանդի փոխազդեցությունից: Մասնավորապես, նշված իոնական ուժերում poly(G)₄-ն ունի բավականին խիտ փաթեթավորում, որի հետևանքով էԲ-ի մոլեկուլների ինտերկալյացիան այդ կառույցի առանձին երկշղթա հատվածներ զգալիորեն դժվարացված է: Այդ մասին են վկայում նաև poly(G)₄-ի հետ էԲ-ի կապման ստեխիոմետրիայի հաստատունի արժեքները առավելագույն հագեցման դեպքում գույգ

նուկլեոտիդի հաշվարկով, ընդ որում, միջավայրի իոնական ուժի մեծացումը հանգեցնում է դրամեծացմանը (տես աղյուսակ 1):

Հայտնի է, որ երկշղթա նուկլեինաթթուների դեպքում $n \approx 2-3$ առավելագույն հագեցման դեպքում: Ստացված տվյալներից հետևում է, որ poly(G)_4 -ի վրա EF -ի մոլեկուլների համար կապման տեղերի թիվը դառնում է ավելի սահմանափակ: Այսինքն, չնայած քառաշղթա poly(G)_4 -ի յուրաքանչյուր շղթալուծույթում առաջացնում է A -ընտանիքին հատուկ կոնֆորմացիոն պարամետրերով բնութագրվող կառուցվածք, նրա քառաշղթա կառուցվածքը որոշ չափով խոչընդոտում է ինտերկալյացիայի պրոցեսին, որի հետևանքով փոխազդեցության հագեցման դեպքում EF -ի մեկ մոլեկուլը կապվում է ավելի մեծ թվով գուանինների հետ:

Աղյուսակում համախմբված են նաև քառաշղթա poly(G)_4 -ի հետ EF -ի կոմպլեքսների ջերմադինամիկ պարամետրերի՝ ΔG -ի, ΔH -ի և ΔS փոփոխությունները՝ լուծույթի իոնական ուժից կախված:

Ստացված տվյալներից հետևում է, որ ΔH -ի արժեքը (~ 2 կկալ/մոլ) իոնական ուժից թույլ է կախված (իոնական ուժը մեծացնելիս այն նվազում է), ընդ որում, եթե այն համեմատենք երկշղթա GC -ի հետ EF -ի ինտերկալյացիոն կոմպլեքսների համար ստացված էնթալպիայի փոփոխության արժեքի հետ, առկա է զգալի տարբերություն: Գրականության տվյալներից հայտնի է, որ երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ EF ինտերկալյացիոն փոխազդեցության դեպքում $\Delta H \approx -(7 \div 9)$ կկալ/մոլ (տես [3]) մեր կողմից ստացված արժեքները առնվազն 4-5 անգամ փոքր են:



Նկար 23. Poly(G)₄-ի հետ էԲ-ի կապման դեպքում lnK-ի կախումը 1/T-ից:

Ամենայն հավանականությամբ, քառաշղթա poly(G)₄-ի հետ EԲ-ի փոխազդեցության դեպքում լիգանդի մոլեկուլները չեն ներդրվում հիմքերի զույգերի հարթությունների միջև այնպես, ինչպես դատելի է ունենում երկշղթա նուկլեինաթթուների դեպքում: Այդ մասին է վկայում նաև այն փաստը, որ լիգանդների ինտերկալյացիայի դեպքում էնթալպիայի փոփոխությունը բավականին մեծ է (ինտերկալյացիան ունի էնթալպիական բնույթ), քանի որ նուկլեինաթթվի երկշղթա կառուցվածքը զգալի փոփոխության է ենթարկվում. տեղի է ունենում պարույրի հետ ուրորում, ինտերկալյացիոն տեղամասից վերև և ներքև երկայնակի առանցքի շեղում 1Å-ով, ջրի կապված մոլեկուլների անցում լուծույթ, ինչպես նաև ինտերկալյացիոն խոռոչի առաջացում [7,32]: Այս տեսակետից քառաշղթա կառույցներում վերը նշված փոփոխությունները զգալիորեն սահմանափակված են մոլեկուլի կառուցվածքի առանձնահատկությունների պատճառով, ուստի լիարժեք ինտերկալյացիան տվյալ դեպքում կարելի է բացառել, ինչն էլ, ամենայն հավանականությամբ, հանգեցնում է էնթալպիայի փոփոխության նվազմանը: Այս առումով, ավելի հավանական է դառնում մասնակի ինտերկալյացիան (տես [57,58,60]):

Վերը նշվածի հաստատումը կարելի է համարել այն, որ էնթրոպիայի փոփոխության չափը բացարձակ արժեքով գրեթե նուն է քառաշղթա և երկշղթա կառուցվածքների հետ EԲ-ի կապման դեպքում, չնայած այն հանգամանքին, որ քառաշղթա կառուցվածքի դեպքում $\Delta S > 0$ (աղյուսակ 1), մինչդեռ երկշղթա poly(G)poly(C) և ԴՆԹ-ի դեպքում $\Delta S < 0$ [151]: Ի տարբերություն երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ EԲ-ի կապման համար ստացված ΔG -ի արժեքների ($\sim -8 \div -9$ կկալ /մոլ, տես [151])՝ քառաշղթա նուկլեինաթթուների հետ փոխազդեցության դեպքում $\Delta G \approx -6.5$ կկալ /մոլ :

Հատկանշական է, որ ΔG -ի համար ստացված արժեքները փորձի սխալի սահմաններում համընկնում են երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ EԲ-ի կիսաինտերկալյացիոն փոխազդեցության համար ստացված տվյալների հետ ($\Delta G \approx -7$), ինչը

հաստատում է այն փաստը, որ քառաշղթա նուկլեինաթթուների հետ
 EF-ն կապվում է կիսահետերկալյացիոն մեխանիզմով:

Աղյուսակ 1. Poly(G)₄-ի հետ EF-ի կապման ջերմադինամիկ

Իոնակ անուժ	T, K	K, M ⁻¹	n	lnK	-ΔG, կկալ /մ ոլ	-ΔH, կկալ /մ ոլ	ΔS, կալ /մոլ ·K
0.11	300	52000	5	10.86	6.47	2.29	13.9
	310	48000	5	10.78	6.64		
	320	41000	5	10.62	6.75		
0.31	300	46500	6	10.75	6.40	2.19	14.1
	310	42000	6	10.65	6.55		
	320	37000	6	10.52	6.68		
0.51	300	42500	7	10.66	6.35	2.14	14.0
	310	38000	7	10.55	6.49		
	320	34000	7	10.43	6.63		

պար
ամե
տրե
րի
արժ
եքն
երը

Այս պիսոժ, աղյուսակ 1-ում համախմբված K-ի, ΔG -ի և ΔS -ի, ինչպես նաև ΔH -ի համար ստացված արժեքները չեն համընկնում EԲ-ի ինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցությանը համապատասխանող արժեքների հետ, սակայն լավ համապատասխանության մեջ են երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ այդ լիգանդի կիսաինտերկալյացիոն եղանակով փոխազդեցության ջերմադինամիկ պարամետրերի արժեքների հետ: Չափարկները ցույց են տալիս, որ poly(G)_4 -ի հետ EԲ-ի փոխազդեցության դեպքում $n=4$ (մեկ նուկլեոտիդի հաշվարկով): Չայտնի է, որ երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ EԲ-ի փոխազդեցության համար $n=5$ (զույգ նուկլեոտիդ) [57,149,150]: Չետևաբար, ի տարբերություն կրկնակի պարուրային նուկլեինաթթուների, քառաշղթա պոլինուկլեոտիդներում EԲ-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, EԲ-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 -ը նշված պայմաններում գտնվում է քառաշղթա վիճակում:

ԵՉՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆ

Ֆիզիկական և քիմիական գործոնների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի կառուցվածքի և կառուցվածքային անցումների վրա բավականաչափ լավ է ուսումնասիրված, մինչդեռ նույն եոտիդային հաջորդականության դերը ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիոն փոխարկումների գործընթացում լիովին ուսումնասիրված չէ, չնայած նույնատիպ նույն եոտիդային հաջորդականություններից կազմված տեղամասերը բնական ԴՆԹ-ում կարող են ունենալ կարևոր և որոշիչ ազդեցություն ԴՆԹ-ի ֆունկցիաների իրականացման և լիզանդների կապման պրոցեսներում: Այս հարցերը ձեռք են բերում լրացուցիչ կարևորություն, երբ հաշվի է առնվում այն փաստը, որ բացի միաշղթա (առաջնային) և երկշղթա (երկրորդային) կառուցվածքներից, ԴՆԹ-ն կարող է ունենալ նաև երրորդային և չորրորդային կառուցվածքներ, որոնք կարող են լինել եռաշղթա, քառաշղթա մոլեկուլների կառուցվածքների կամ օղակաձև ԴՆԹ-ի ձևով, որին հատուկ է մոլեկուլի գերպարունում:

Աշխատանքում ստացված տվյալները բացահայտել են, որ ԷԲ-ը՝ կոնցենտրացիայից կախված, ԴՆԹ-ի միա- և երկշղթա կառուցվածքների հետ կապվում է տարբեր եղանակներով: Ընդ որում, իրականացվել է ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում ի հայտ եկող իզոբեստիկ կետի վերլուծություն, որի հիման վրա եզրակացվել է, որ ուսումնասիրված լիզանդների՝ ԷԲ-ի, ինչպես նաև ՄԿ-ի սպեկտրաֆոտոմետրիկ բնութագրերը կախված են նրանց կապման մեխանիզմներից, քանի որ ստացված տվյալները հաստատում են, որ ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրներում, $\lambda=510$ նմ ալիքի երկարության տակ առաջանում է իրական իզոբեստիկ կետ, մինչդեռ ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների դեպքում կլանման սպեկտրները մոտենում են միմյանց որոշակի կետի շրջակայքում, սակայն հատվում են միմյանց հետ տարբեր կետերում: ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների մաքսիմումների ոչ մեծ երկարալիք շեղումը ՄԿ-ի կլանման մաքսիմումի համեմատ և հստակ դրսևորվող ԻԿ-ի բացակայությունը կարելի է բացատրել, հիմնվելով այն փաստի վրա,

որ լուծույթի 0.02 մոլ իոնական ուժի դեպքում այս լիգանդը լրիվ ինտերկալյացիայի չի ենթարկվում:

Ստացված տվյալները նաև ցույց են տվել, որ ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը որոշակիորեն կախված է հիմքերի տիպից և նույլ եոտիդային հաջորդականությունից: Մասնավորապես, ադենինային և թիմինային ազոտային հիմքերով նույլ եոտիդներից կազմված պոլի նուկլեոտիդները ունեն տարբեր կառուցվածքներ, եթե դրանց նուկլեոտիդային հաջորդականությունները տարբեր են, ինչը պայմանավորում է դրանց հետ լիգանդի կապման բնույթը: Այսպես, ստացված տվյալներից բացահայտվում է, որ երկշղթա poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի հետ ԷԲ-ը կապվում է առնվազն երեք եղանակներով՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և Էլեկտրաստատիկ, մինչդեռ poly(dA)-poly(dT)-ի հետ այդ լիգանդը կապվում է երկու եղանակներով՝ ինտերկալյացիոն և կիսաինտերկալյացիոն: Ընդ որում, այդ երկու պոլի նուկլեոտիդների հետ միևնույն մեխանիզմով կապման հաստատունների արժեքները տարբերվում են. poly(dA)-poly(dT)-ի դեպքում K-ի արժեքը ավելի փոքր է, քան poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ի դեպքում: Այս փաստը պայմանավորված է նրանով, որ poly(dA)-poly(dT)-ն ավելի հիդրատացված է, որի հետևանքով ունի ավելի կոշտ կառուցվածք, քան poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]-ն, ինչն էլ դժվարացնում է ինտերկալյատորի մոլեկուլների ներթափանցումը հիմքերի զույգերի հարթությունների մեջ: Poly(dA)-poly(dT)-ի մյուս առանձնահատկությունը կայանում է նրանում, որ դրա հետ ԷԲ-ի թույլ, Էլեկտրաստատիկ մեխանիզմով փոխազդեցությունը չի հայտնաբերվում:

Հայտնաբերվել է նաև, որ poly(dA)-poly(dT)-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը կոոպերատիվ է, որը, որոշ դեպքերում կարող է ունենալ կարևոր կենսաբանական նշանակություն, մասնավորապես, նպաստել բջջում ԴՆԹ-ի գործառնույթների ավելի նուրբ մոդուլացմանը:

Նաև հայտնաբերվել է, որ լուծույթի pH-ից կախված՝ poly(dA) պոլի նուկլեոտիդը կարող է գտնվել կառուցվածքային տարբերվիճակներում՝ 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

ինտերկալյացիոն կամ կիսաինտերկալյացիոն եղանակներով՝ կախված պոլինուկլեոտիդի կառուցվածքից: Ստացված տվյալները նաև բացահայտում են, որ նուկլեինաթթուների հետ դասական ինտերկալյատոր ԷԲ-ի փոխազդեցության մեխանիզմները ունիվերսալ են և դրանց դրսևորումը կախված չէ միջավայրի պայմաններից [80]:

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

Չայտնի է, որ երկշղթա նուկլեինաթթուների հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության համար n=5 (զույգ նուկլեոտիդ) [57,149,150]: Չետևաբար, ի տարբերություն կրկնակի պարուրային նուկլեինաթթուների, քառազղթա 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՝ 0.011 մոլ և ավելի, poly(G)₄-ն գտնվում է քառազղթա 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 քառազղթա վիճակում:

ԵԶՐԱՅԱՆԳՈՒՄՆԵՐ

1. ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների կլանման սպեկտրների մաթեմատիկական մշակման մեթոդը թույլ է տվել հաստատել ու իզոբեստիկ կետի ֆիզիկական գոյությունը կլանման սպեկտրներում և մեծ ճշգրտությամբ որոշել ու ավիքի այն երկարությունը, որի տակ այն ի հայտ է գալիս: Առաջարկված մեթոդով ստացվող արդյունքները ճշտորեն համընկել են փորձարարական տվյալների հետ:
2. ԴՆԹ-ի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում ԷԲ-ի հետ դրա կոմպլեքսների կլանման սպեկտրները շեղվում են իզոբեստիկ կետից, որի հետևանքով սպեկտրների թվից՝ k -ից σ -ի կախվածության կորի վրա առաջանում են երկու տեղամասեր, ինչը վկայում է, որ ԴՆԹ-ի վրա առկա են ԷԲ-ի կապման առնվազն երկու տիպի կենտրոններ:
3. ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները կախված են նուկլեոտիդների հիմքերի տիպից և դրանց հաջորդականությունից. $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ տիպի պոլինուկլեոտիդի հետ ԷԲ-ն կապվում է երեք եղանակներով՝ ինտերկալյացիոն, կիսաինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ, $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ տիպի պոլինուկլեոտիդի հետ երկու՝ ինտերկալյացիոն և կիսաինտերկալյացիոն: $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ -ի և $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ հետ ԷԲ-ի կապման հաստատունների արժեքները տարբերվում են. $\text{poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ի դեպքում K -ի արժեքները ավելի փոքր են, քան $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ -ի դեպքում:
4. $\text{Poly}(dA)\text{-poly}(dT)$ -ի հետ ԷԲ-ի փոխազդեցությունը կոոպերատիվ է, իսկ փոխազդեցության էլեկտրաստատիկ եղանակը չի հայտնաբերվում, մինչդեռ $\text{poly}[d(A-T)]\text{-poly}[d(A-T)]$ -ի դեպքում ԷԲ-ի փոխազդեցությունը կոոպերատիվ է և համանման է բնական ԴՆԹ-ի հետ այդ իգանդի փոխազդեցությանը:

5. ԷԲ-ը փոխազդում է poly(dA) պոլիմերի էնտրոպիայի հետ տարբեր եղանակներով, քանի որ այդ պոլիմերը, կախված լուծույթի pH-ից, կարող է գտնվել տարբեր կառուցվածքային վիճակներում. pH \approx 3,5-ում այն գտնվում է երկշղթա վիճակում, որի հետ ԷԲ-ն կապվում է ինտերկալացիոն եղանակով, pH \approx 7,0, pH \approx 5,5 և pH \approx 2,5 պայմաններում poly(dA)-ն գտնվում է միաշղթա վիճակում, որի հետ այդ լիգանդը կապվում է կիսաինտերկալացիոն եղանակով:

6. Poly(G)₄-ի հետ ԷԲ-ն կապվում է կիսաինտերկալացիոն մեխանիզմով, քանի որ poly(G)₄-ԷԲ կոմպլեքսների ջերմադինամիկ պարամետրերի արժեքները լավ համապատասխանության մեջ են ԴՆԹ-ի հետ լիգանդի՝ այդ եղանակով կապման համապատասխան պարամետրերի արժեքների հետ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. Москва – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015, 188с.
2. Gregory S., Barlow K.F., McLay K.E., Kaul R., Swarbreck D., Dunham A., Scott C.E., Howe K.L., Woodfine K. // The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. Nature, 2006, 441, p. 315-321.
3. Lane A.N., Jenkins T.C. // Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. Q. Rev. Biophys., 2000, v. 33, N3, p. 255-306.
4. Lin X., Ni Yo., Kokot S. // An electrochemical DNA-sensor developed with the use of Methylene Blue as a redox indicator for the detection of DNA damage induced by endocrine-disrupting compounds. Analitica Chimica Acta, 2015, 867, p 29-37.
5. Deng P.H., Xu Z.F., Kuang Y.F. // Electrochemical determination of bisphenol A in plastic bottled drinking water and canned beverages using a molecularly imprinted chitosan-graphene composite film modified electrode. Food Chem, 2014, 157, p. 490-497.
6. Jung Yu.K., Park Hy.G. // Colorimetric detection of clinical DNA samples using an intercalator-conjugated polydiacetylene sensor. Biosensors and Bioelectronic, 2015, 72, p. 127-132.
7. Кантор Ч., Шимелл П. // Биофизическая химия, в 3-х т., М.: Мир, 1984.
8. Suh D., Chaires J.B. // Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. Bioorganic Med. Chem., 1995, V. 3, p. 723-728.
9. Маршелл Э. // Биофизическая химия, в 2-х т., М.: Мир, 1981.
10. Эдсолл Дж., Гатфренд Х. // Биотермодинамика, М.: Мир, 1986.
11. Daunne M. // In: Molecular Biophysics. Structures in motion. Oxford University Press, 1999, p. 499.
12. Healy E. // Quantitative Determination of DNA–Ligand Binding Using Fluorescence Spectroscopy. J. Chem. Educ., 2007, 84(8) , p.1304.
13. Tinoco Jr. I., Sauer K. Wang, J. Puglisi J.D., Harbison G., Rovnyak D // Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences (5th Edition). Prentice Hall; 5th edition, 2013, p.696.
14. Chaires J.B. // Energetics of drug-DNA interactions. Biopolymers, 1998, v. 44, p. 201-215.

15. Haq I. // Isothermal titration calorimetry in the study of DNA-drug interactions. In *Biocalorimetry* (eds. Ladbury J.E. & Chowdhry B.Z.), 1998, Chichester, UK: Wiley and Sons, p. 39-61.
16. Haq I., Jenkins T.C., Chowdhry B.Z., Ren J., Chaires J.B. // Parsing the free energy of drug-DNA interactions. *Methods Enzymol.*, 2000, v. 323, p. 373-405.
17. Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B. // Specific binding of Hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)₂ duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *J.Mol. Biol.*, 1997, v. 271, p. 244-257.
18. Banerjee A., Majumder P., Sanyal S., Singh J., Jana K., Das C., Dasgupta D. // The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio*, 2014, 4(1), pp.251-259.
19. Bailly S.A., Graves D.E., Hill R., Marsch G. // Influence of DNA base sequence on the binding energetic of actinomycin D. *Biochemistry*, 1993, v. 32, p. 5881-5887.
20. Berman H.M. // Hydration of DNA: take 2. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1994, v. 4, p. 345-350.
21. Berman H.M., Gelbin A., Westbrook J. // Nucleic acid crystallography: a view from the nucleic acid database. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1996, v. 66, p. 255-288.
22. Rentzeperis D., Ko J., Marky L.A. // Contribution of loops and nicks to the formation of DNA dumbbells: melting behavior and ligand binding. *Biochem.*, 1993, v. 16, N32 (10), p. 2564-2572.
23. Rentzeperis D., Marky L.A., Dwyer T.J., Geierstanger B.H., Pelton J.G., Wemmer D.E. // Interaction of minor groove ligands to an AAATT/AATTT site: correlation of thermodynamic characterization and solution structure. *Biochemistry*, 1995b, v. 34, N9, p. 2937-2945.
24. Chaires J.B., Lang F.F., Przewloka T., Fokt I., Ling Y.H., Perezsoler R., Priebe W. // Structure-based design fill of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *J. Med. Chem.*, 1997, v. 40, p. 261-266.
25. Chaires J.B., Satyanarayana S., Sun D., Fokt I., Przewloka T., Priebe W. // Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*, 1996, v. 35, p. 2047-2053.
26. Holbrook J.A., Capp M.W., Saecker R.M., Record M.T. // Enthalpy and heat capacity changes of an oligomeric DNA duplex: interpretation of coupled processes of formation and association of single-stranded helices. *Biochemistry*, 1999, v. 38, p. 8409-8422.
27. Hopkins H.P., Fumero J., Wilson W.D. // Temperature-dependence of enthalpy

- changes for ethidium and propidium binding to DNA – effect of alkylamine chains. *Biopolymers*. 1990, v. 29, p. 449-459.
28. Searle M.S., Lane A.N. // ³¹P NMR investigation of the backbone conformation and dynamics of the hexamer duplex d(GCATGC)₂ in its complex with the antibiotic Nogalamycin. *FEBS Lett.* 1992, v. 297, p. 292-296.
 29. Lane A.N. // Conformation of nucleic acids: problems and solutions. In ACS Symposium Series 682, *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, 1998, p. 106-121.
 30. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. // Complex-formation of ethidium bromide with poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2005, v. 22, N 4, p. 465-470.
 31. Gale E.F., Reynolds P.E., Cundlife E., Richmond M.H., Waring M.J. // The molecular basis of antibiotic action. London-New York-Sydney-Toronto, 1972, p. 500.
 32. Зенгер В. // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. 1987, “Мир”: М. 584 с.
 33. Paul P., Hossain M., Yadav R.C., Kumar G.S. // Biophysical studies on the base specificity and energetics of the DNA interaction of photoactive dye thionine: spectroscopic and calorimetric approach. *Biophys Chem.* 2010, 148, p.93–103.
 34. Rescifina A., Zagni C., Varrica M., Pistarà V., Corsaro A. // Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 74, pp.95-115.
 35. Zimmer Ch., Wohnert U. // Non-intercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. In *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1986, v. 47, p. 31-112.
 36. Tan Z., Chen S. // Nucleic Acid Helix Stability: Effects of Salt Concentration, Cation Valence and Size, and Chain Length. *Biophysical Journal*, 2006, 90(4), pp.1175-1190.
 37. Борисова О.Ф., Гречко В.В., Кузнецова Н.В., Сахарова Н.К., Тимохина Г.И. // Сравнение пространственной организации РНК фага MS2 и 16S рРНК. Взаимодействие с красителями, специфичными к вторичной структуре, нативной РНК и после ее гидролиза нуклеазой S1. *Мол. биол.*, 1987, т. 21, N2, с. 515-528.
 38. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. // Theoretical treatment of melting of

- complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1996, v. 14, N2, p. 275-283.
39. Neidle S. // *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2008, "Elsevier", 302 p.
 40. Vladimir N., Sinden R.P. // *DNA: Alternative Conformations and Biology*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
 41. Brahms S. , Vergne J. , Brahms J.G. // Natural DNA sequences form left-handed helices in low-salt solution under conditions of topological constraint, *J. Mol. Biol.* 1982, N 162, p. 473-493.
 42. Herbert A, Rich A. // Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica.* 1999; N 106 (1-2), p. 37-47.
 43. Mirkin S.M. , Lyamichev V.I. , Drushlyak K.N. , Dobrynin V.N. ,Filippov S.A. , Frank-Kamenetskii M.D. // DNA H form requires a homopurine-homopyrimidine mirror repeat, *Nature* 1987, N 330, p. 495-497.
 44. Soyfer V.N., Vladimir N. // *Triple-Helical Nucleic Acids*. New York: Springer, 1995, ISBN 978-0-387-94495-1.
 45. Wolfe A.L., Singh K., Zhong Y., Drewe P., Rajasekhar V.K., Sanghvi V.R., Mavrakis K.J., Jiang M., Roderick J.E., Van der Meulen J., Schatz J.H., Rodrigo C.M., Zhao C., Rondou P., de Stanchina E., Teruya-Feldstein J., Kelliher M.A., Speleman F., Porco J.A. Jr., Pelletier J., Ratsch G., Wendel H.G. // RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*, 2014, 513(7516), p. 65-70.
 46. G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, Sh. Balasubramanian // Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature Chemistry*, 2013, N 5, p. 182–186.
 47. Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S. // Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *NAR*, 2006, N 34(19), p. 5402–5415.
 48. Решетников Р.В., Копылов А.М., Головин А.В. // Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов. *Acta Naturae*, 2010, N 2 (4): с. 80-89.
 49. Huppert J. L., Balasubramanian S. // Prevalence of quadruplexes in the human genome. *NAR*, 2005, N 33 (9), p. 2908–2916.
 50. Luedtke N. W. // Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules. *Chimia.* 2009, N 63(3), p. 134-39.
 51. Koirala D., Dhakal S., Ashbridge B., Sannohe Y., Rodriguez R., Sugiyama H., Balasubramanian S., Mao H. // A single-molecule platform for investigation of

- interactions between G-quadruplexes and small-molecule ligands. *Nat Chem.* 2011, N 28, v. 3(10), p. 782-789.
52. Hunter C.A., Lu X.J. // DNA base-stacking interactions: a comparison of theoretical calculations with oligonucleotide X-ray crystal structures. *J. Mol. Biol.*, 1997, v. 265, p. 603-619.
 53. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. // Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2000, v. 18, N 2, p. 231-235.
 54. Jones R.L., Wilson W.D. // Effect of ionic strength on the pK_a of ligands bound to DNA. *Biopolymers*, 1981, 20, p. 141-154.
 55. Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., de Pascual-Teresa B. // Ramos a intercalators as anticancer drugs. *Curr Pharm Des*, 2001, p. 1745–1780.
 56. Graves D.E., Velea L.M. // Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Curr Org Chem*, 2000, p. 915–929.
 57. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. // The Binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. *Exp. and Mol. Medicine*, 2003, v. 35, N6, p. 527-533.
 58. Wadkins R.M., Jares-Erijman E.A., Klement R., Rudiger A., Jovin T.M. // Actinomycin D binding to single-stranded DNA: Sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and 1H NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 1996. v. 262. p. 53-68.
 59. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Болотин П.А., Барановский С.Ф., Паркес Х., Дэвис Д. // Мол. биол. 1995. т. 29. с. 326-338.
 60. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. // Комплексообразование бромистого этидия с одноцепочечным некоплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApApGpC). Мол. биол., 1997, т. 31, N2, с. 263-273.
 61. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Torosyan M.A., Karapetian A.T. // The Influence of GC/AT Composition on Intercalating and Semi-Intercalating Binding of Ethidium Bromide to DNA. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, 23, 11, p. 2016-2020.
 62. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. // Study of ethidium bromide interaction peruliarities with DNA. *Exp. and Mol. Medicine*, 2001. v. 33. N4. p. 205-208.
 63. Zipper H., Brunner H., Bernhangen J., Vitzthum F. // Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and

- methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:103.
64. Biver T., Biasi A.D., Secco F., Venturini M., Yarmoluk S. Cyanine dyes as intercalating agents: kinetic and thermodynamic studies on the DNA/Cyan40 and DNA/CCyan2 systems. *Biophys J*. 2005, 89, p. 374–383.
 65. Wu J., Du F., Zhang P., Khan I.A., Chen J., Liang Y. // Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: implications for the biological function of aluminum. *J Inorg Biochem*, 2005, 99, p.1145–1154.
 66. Хребтова А.С., Духопельников Е.В., Березняк Е.Г., Гладковская Н.А., Зинченко А.В. // *Биофизический Вестник*, 2010, Вып. 25 (2), стр. 26-33.
 67. Bai Y., Ge Q., Wang J., Li T., Liu Q., Lu Z. // Investigation of DNA–protein sequence-specific interactions with a ds-DNA array. *Molecules*, 2005, 10, p. 417–426.
 68. Arya D.P., Willis B. // Reaching into the major groove of B-DNA: synthesis and nucleic acid binding of a Neomycin-Hoechst 33258 conjugate. *J Am Chem Soc*, 2003, 125, p. 12398–12399.
 69. Trieb M., Rauch C., Wibowo F.R., Wellenzohn B., Liedl K.R. // Cooperative effects on the formation of intercalation sites. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32, p.4696–4703.
 70. Belozeroва I., Levicky R. // Melting Thermodynamics of Reversible DNA/Ligand Complexes at Interfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(45), p.18667-18676.
 71. Rouzina I., Bloomfield V. // Heat Capacity Effects on the Melting of DNA. 1. General Aspects. *Biophysical Journal*, 1999, 77(6), p.3242-3251.
 72. Chang Y., Chen C, Hou M. // Conformational Changes in DNA upon Ligand Binding Monitored by Circular Dichroism. *IJMS*, 2012, 13(12), p.3394-3413.
 73. Teif V. // Ligand-Induced DNA Condensation: Choosing the Model. *Biophysical Journal*, 2005, 89(4), p.2574-2587.
 74. Karapetian A.T., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: The effect of two types of interaction of ligand on the parameters of transition. *J.Biomol. Struct. Dyn.*, 1990, V. 8, N1, p. 123-130.
 75. Lando D., Fridman A., Chang C., Grigoryan I., Galyuk E., Murashko O., Chen C., Hu C. // Determination of melting temperature and temperature melting range for DNA with multi-peak differential melting curves. *Analytical Biochemistry*, 2015, 479, pp.28-36.
 76. Zhabinskaya D., Benham, C. // Theoretical Analysis of the Stress Induced B-Z Transition in Superhelical DNA. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7(1).
 77. Тищенко Е. И., Карапетян А.Т., Борисова О.Ф. // Гетерогенные комплексы

- бромистого этидия их и роль в стабилизации (dA)_n-(dT)_n структур. 1996, т. 30, N 6, с. 1970-1377.
78. Boer D., Canals A., Coll M. // DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. Dalton Trans., 2009, (3), p.399-414.
 79. Антонян А.П. // Кислотная денатурация комплексов Бромистого этидия с ДНК. Биолог. Журнал Армении. 2013, 2 (65), с. 31-35.
 80. Mukhaelyan Zh. H., Antonyan A. P., Minasyants M.V. // Investigation of acidic denaturation of Ethidium bromide complexes with DNA. J. Proceeding of the YSU, 2014, N 2, p. 48-53.
 81. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. // Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA, J. Biomol. Struct. Dyn, 2008, V 25, N 6, p.641-646.
 82. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Hovhannisyan G.G., Shahinyan M.A. // Analysis of experimental binding curves of EtBr with single- and double-stranded DNA at small fillings. Modern Physics Letters B, 2014, V. 28, N 22, 1450178.
 83. Platt U., Stutz J. // Differential optical absorption spectroscopy. 2008, Berlin: Springer Verlag.
 84. García-González R., Costa-García A., Fernández-Abedul M.T. // Methylene blue covalently attached to single stranded DNA as electroactive label for potential bioassays. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, v. 191, , p. 784–790
 85. L.A. Hambardzumyan // Thermodynamic investigation of methylene blue complexes with DNA. YSU Sci. Reports .N. 1, 2013 p. 23–27.
 86. Mudasir A., Wahyuni E.T., Tjahjono D.H., Yoshioka N., Inoue H. // Spectroscopic studies on the thermodynamic and thermal denaturation of the ct-DNA binding of methylene blue. Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010, 77(2), p. 528-534.
 87. Nogueira J.J., González L. Molecular dynamics simulations of binding modes between methylene blue and DNA with alternating GC and AT sequences, Biochemistry, 2014,15;53(14), p.2391-2412.
 88. M. R. Bugs, M. L. Cornelio // A new biophysics approach using photoacoustic spectroscopy to study the DNA-ethidium bromide interaction. Eur.Biophys. J, 31, 2002, p. 232–240.

89. Rohs R., Sklenar H. // Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: Minor groove binding is favored over intercalation. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 2004, v. 21, 5, p. 699-711.
90. R. Rohs, H. Sklenar, R. Lavery, B. Roder. // Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. *Journal of The American Chemical Society*, 2000, v.122, p. 2860-2866.
91. Nafisi S., Saboury A. A., Keramat N., Neault J.F., Tajmir-Riahi A.A. // Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *J. Mol. Struct.*, 2007, 827, p. 35-43.,
92. Changlun T., Zhou H., Jianmin W. // Interaction between methylene blue and calf thymus deoxyribonucleic acid by spectroscopic technologies. *J. Fluoresc.*, 2010, 20, p. 261-267
93. Hossain M., Giri P., Kumar G. S. // DNA intercalation by quinacrine and methylene blue: A comparative binding and thermodynamic characterization study. *DNA and Cell Biology*, 2008, 27, N2. p. 81-90.
94. Волкова О. С., Кузнецова Е. В., Кириллова Л. Н.. // Практикум по физической химии. Спектрофотометрия. Кислотно-основные равновесия. Методическое пособие. г.Новосибирск, ред.-изд. центр Нов. гос. ун-та (2005) 15-17.
95. Вязьмин С. Ю., Рябухин Д. С., Васильев А. В. // Электронная спектроскопия органических соединений. Учебное пособие. г.Санкт-Петербург, изд-во. СПбГЛТА, (2011) 10-11.
96. Pouet M.-F., Baures E., Vaillant S., Thomas O. // Hidden isosbestic Point(s) in Ultraviolet Spectra. *Applied spectroscopy*, 2004, 58, №4, p. 486-490.
97. Lofty H.M. // Absorbance subtraction and amplitude modulation as novel spectrophotometric methods for the analysis of binary mixtures. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 6, N1, p.735-741.
98. Geissler P. // Temperature Dependence of Inhomogeneous Broadening: On the Meaning of Isosbestic Points. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127(42), p.14930-14935.
99. Sanjeev R., Jagannadram V., Veda Vrath R. // Implications of a novel interpretation of the isosbestic point. *Chemistry in New Zealand*, 2012, p. 133-135.
100. Berlett B. S., Levine R. L., Stadtman E. R. // Use of Isosbestic Point Wavelength Shifts to estimate the fraction of a Precursor That Is Converted to a Given product. *Analytical Biochemistry*, 2000, 287 p.329-333.
101. Вардеванян 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 (6), 2014, p. 970-973.

102. Greger M., Kollar M. & Vollhardt, D. // Isosbestic points: How a narrow crossing region of curves determines their leading parameter dependence. Phys. Rev. B, 2013, 87, 195140.
103. Frank-Kamenetskii M.D. // Unraveling DNA. The most important molecule of life. Perseus Books. Reading Massachusetts. 1997, 214 p.
104. Marky L.A., Macgregor R.Jr. // Hydration of dA-dT polymers: Role of water in the thermodynamics of ethidium and propidium interaction. Biochemistry, 1990, v. 29, p. 4805-4811.
105. Nelson H.C.M., Finch J.T., Luisi B.F., Klug A. // The structure of an oligo(dA)-oligo(dT) tract and its biological implications. Nature, 1987, v. 330, p. 221-226.
106. Nikolaev V.A., Surovaia A.N., Sidorova N., Grokhovskii S.L., Zasedatelev A.S., Gurskii G.V., Zhuze A.L. // Ligands with affinity to specific sequences of DNA base pairs. X. Synthesis and binding of netropsin analogues containing chelating copper ion oetide with DNA. Mol. Biol., 1993, v. 27(1), p. 192-210.
107. Suh D. // Environments of ethidium binding to allosteric DNA: II. Accessibility, mobility and mode of binding. Exp. and Mol. Medicine, 2000. v. 32, N4, p. 204-209.
108. Chalikian T.V., Plum G.E., Sarvazyan A.P., Breslauer K.J. // Influence of drug binding on DNA hydration: acoustic and densimetric characterizations of netropsin binding to the poly(dA-dT)-poly(dA-dT) and poly(dA)-poly(dT) duplexes and the poly(dT)-poly(dA)-poly(dT) triplex at 25 °C. Biochemistry, 1994, v. 26, N33 (29), p. 8629-8640.
109. Vardevanyan P.O., Elbakyan V.L., Shahinyan M.A., Minasyants M.V., Parsadanyan M.A., Sahakyan N.S. // Determination of the isosbestic point in the absorption spectra of DNA-ethidium complexes. Journal of Applied Spectroscopy, 2015, v. 81, N 6, p.1060-1063.
110. Тоноян Ш.А., Айрапетян Г.Н., Иванов А.В., Багдян И.В., Царукян А.В. // Конкурентное и неконкурентное взаимодействие растворителя с биополимерами при переходе спираль-клубок. Изв. НАН Армении, Физика, 2009, 44, 456.
111. Мамасакхлисов Е.Ш. // Теория конденсации ДНК при наличии растягивающей силы: модель Зимма-Брэгга. Изв. НАН РА, Физика, 2010, 45, с. 142-147.
112. Тоноян Ш.А., Мирзаханян А.С., Айрапетян Г.Н., Царукян А.В., Морозов В.Ф. // Переходы спираль-клубок биополимеров в растворителях, взаимодействующих

- конкурентным и неконкурентным способами. Изв. НАН Армении, Физика, 2010, 45, с. 133-141.
113. Бадасян А.В., Григорян А.В., Чухаджян А.Ю., Мамасакхлисов Е.Ш., Морозов В.Ф. // Гамильтониан и характеристическое уравнение для обобщения модели перехода спираль-клубок с учетом стэкинга. Изв. НАН РА, Физика, 2002, 37(5), с. 320-322.
114. Monaselidze J., Majagaladze G., Barbakadze Sh., Khachidze D., Gorgoshidze M., Kalandadze Y., Haroutiunian S., Dalyan Y., Vardanyan V. // Microcalorimetric investigation of DNA, poly(dA)-poly(dT) and poly[d(A-C)]-poly[d(G-T)] melting in the presence of water soluble (Mezo tetra (4 N oxyethylpyridyl) Porphyrin) and its Zn complex. J. Biomol, Strcy. Dyn., 2007, v. 25, N 4, p. 419-424.
115. Bailay S.A., Graves D.E., Hill R., Marsch G. // Influence of DNA base sequence on the binding energetic of actinomycin D. Biochemistry, 1993, v. 32, p. 5881-5887.
116. Hunter C.A. // Sequence-dependent DNA structure: the role of base-stacking interactions. J. Mol. Biol., 1993, v. 230, p. 1025-1054.
117. Hunter C.A., Lu X.J. // DNA base-stacking interactions: a comparison of theoretical calculations with oligonucleotide X-ray crystal structures. J. Mol. Biol., 1997, v. 265, p. 603-619.
118. Bates P.J. Laber D.A., Miller D.M., Thomas S.D., Trent J.O. // Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer: *Exp Mol Pathol.*, 2009, 86(3), pp 151-64.
119. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd edition, Springer, 2006, 938p.
120. Tsuboi M., Benevides J., Thomas G. // The Complex of Ethidium Bromide with Genomic DNA: Structure Analysis by Polarized Raman Spectroscopy. Biophysical Journal, 2007, 92(3), pp.928-934.
121. Baranovskii S.F., Chernyshev D.N., Buchelnikov A.S., Evstigneev M.P. // Thermodynamic analysis of complex formation of ethidium bromide with DNA in water solutions. Biophysics, 2011, V. 56(2), p. 214 - 219.
122. Борисова О.Ф., Щелкина А.К., Вардеванян П.О., Антонян А.П., Карапетян А.Т., Манукян Г.А. // Связывание бромистого этидия с нативным и денатурированным poly(dA)-poly(dT). Мол. биол., 2000, т. 34, N2, с. 310-315.
123. Martinez R., Chacon-Garcia L. // The search of DNA-Intercalators as antitumoral drugs: What if worked and what did not work. Current Medicinal Chemistry, 2005, 12, p. 127-151.

124. Monaco R. R. // A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation. *J. Biomol. Struct. Dyn*, 2007, V 25, N 2, p. 119-125.
125. Rabbani A., Finn R., Thambirajah A., Ausió J. Binding of Antitumor Antibiotic Daunomycin to Histones in Chromatin and in Solution. *Biochemistry*, 2004, 43(51), p.16497-16504.
126. Wheate N.J., Brodie C.R., Collins G.J., Kemp S., Aldrich-Wright J.R. // DNA Intercalators in cancer therapy: Organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2007, 7, p. 627-648.
127. Tzyh-Chyang Tang and Hsuan-Jung Huang // Electrochemical Studies of the Intercalation of Ethidium Bromide to DNA. *Electroanalysis* 1999, 11(16), p.1185-1190.
128. Petrovic A., Polavarapu, P. // Structural Transitions in Polyriboadenylic Acid Induced by the Changes in pH and Temperature: Vibrational Circular Dichroism Study in Solution and Film States. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(49), p.23698-23705.
129. Scovell W.M. // Structural and conformational studies of polyribonucleic acid in neutral and acid solution. *Biopolymers*, 1978, N 17, p. 969-984.
130. Neidle S, Balasubramanian S, Eds. *Quadruplex Nucleic Acids*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry 2006.
131. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco Jr I. // *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*. Sausalito, US: University Science Books 2000.
132. Huppert J.L., Balasubramanian S. // G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35, p. 406-413.
133. Wu Y., Brosh R.M. // G-quadruplex nucleic acids and human disease. *FEBS J.*, 2010, 277, p.3470-3488.
134. Phana A.T., Mergny J-L. // Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson–Crick double helix. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(21), p. 4618–4625.
135. Vologodskii A. // *Biophysics of DNA.*, 2015, Cambridge Press, p. 272.
136. Vorlickova M., Kejnovska I., Sagi J., Renciuik D., Bednarova K., Moltova J., Kypr J. // Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*, 2012, 57(1), p. 64-75.
137. Adrian M., Heddi B., Phan A.T. // *NMR spectroscopy of G-quadruplexes: Methods*, 2012, 57(1) p. 11-24.
138. Poon K., Macgregor Jr. R.B. // Formation and structural determinants of multi-stranded guanine-rich DNA: *Biophys Chem*, 2000, 84(3), p. 205-216.

139. Kim B.G., Shek Y.L., Chalikian T.V. // Polyelectrolyte effects in G-quadruplexes: *Biophys Chem*, 2013, 184(31), p. 95-100.
140. Han H., Hurley L.H. // G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol Sci.*, 2000, 21(4), p. 136-42.
141. Neidle S., Balasubramanian S. // *Quadruplex Nucleic Acids*. – London: “Royal Society of Chemistry” 2006, 254 p
142. Holder I.T., Drescher M., Hartig J.S. // Structural characterization of quadruplex DNA with in-cell EPR approaches: *Bioorg Med Chem.*, 2013, 21(20), p. 6156-61.
143. Bochman M.L., Paeschke K., Zakian V.A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet.*, 2012, 13(11), p. 770-780.
144. Zarudnaya M.I., Stepanyugin A.V., Potyahaylo A.L., Hovorun D.M. // Electrophoretic study of conformational transitions in poly(G) as a function of monovalent cations. *Biopolym Cell.*, 2007, 23(2) p. 122-129.
145. Mendoza O., Elezgaray J., Mergny J.L. // Kinetics of quadruplex to duplex conversion. *Biochimie*. 2015, p. 225-233.
146. Huppert J.L., Balasubramanian S. // G-quadruplexes in promoters throughout the human genome, *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35(2), p. 406–413.
147. Maizels N. // Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2006.
148. Amrane S., Kerkour A., Bedrat A., Violet B., Andreola M.-L., Mergny J.-L., // Topology of a DNA G-quadruplex structure formed in the HIV-1 promoter: a potential target for Anti-HIV drug development, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136(14), p. 5249-5252.
149. Babayan Yu., Manzini G., Xodo L.E., Quadzifoglio F. Base specificity in the interaction of ethidium with synthetic polyribonucleotides // *Nucleic Acids Research*, 1987, V. 15, N.14, p. 5803-5812.
150. Nelson J.W., Tinoco I. Interaction of ethidium ion into DNA and RNA oligonucleotides // *Biopolymers*, 1984, V.23, N.2, p. 213-233.
151. Chaires J.B. // A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode: *Arch Biochem. Biophys.*, 2006, 453, p. 26-31.