

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՓԱՐՄԱԴԱՆՅԱՆ ՄԱՐԻՆԵ ԱՇՈՏԻ

ՏԱՐԱԲՆՈՒՅԹ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ POLY(rA)-POLY(rU)  
ՄԻՆԹԵՏԻԿ ՊՈԼԻԿՈՒԿԼԵՈՏԻԴԻ ՀԵՏ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2021

---

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПАРСАДАНЯН МАРИНЭ АШОТОВНА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЛИГАНДОВ С СИНТЕТИЧЕСКИМ  
ПОЛИНУКЛЕОТИДОМ poly(rA)-poly(rU)

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН 2021

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

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

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ֆիզմաթ.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր  
Ս.Գ.Հարությունյան  
Կենս.գիտ.դոկտոր,պրոֆեսոր  
Կ.Բ.Նազարյան  
Կենս.գիտ.դոկտոր Ն.Մ.Այվազյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Կրասսանի ԳԱ Է.Լ. Անդրոնիկաշվիլիի  
անվան ֆիզիկայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2021թ. նոյեմբերի 30-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 Սասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2021թ. հոկտեմբերի 19-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղարի պարտականությունները կատարող, կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ Ա.Պ.Անտոնյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете  
Научный консультант: доктор биол.наук, профессор П.О.Вардеванян

Официальные оппоненты: доктор физ.мат. наук, профессор Арутюнян С.Г.  
доктор биол. наук, профессор Назарян К.Б.  
доктор биол. наук Айвазян Н.М.

Ведущая организация: Институт физики им. Э.Л. Андроникашвили АН Грузии

Защита диссертации состоится 30-го ноября 2021г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 19-го октября 2021г.

Исполняющий обязанности ученого секретаря специализированного совета 051, доктор биол. наук, доцент А.П.Антонян

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Нуклеиновые кислоты играют ключевую роль в хранении и экспрессии генетического материала, лежащего в основе жизнедеятельности клетки. Этим обуславливается растущий интерес к биофизическим исследованиям процессов, протекающих с участием ДНК и, в частности, РНК.

Структурные особенности РНК во многом обуславливаются присутствием различных молекул, которые, связываясь с ней, могут стабилизировать ее ту или иную структуру. Эти свойства РНК делают ее хорошей мишенью для многих нековалентно связывающихся соединений, в том числе, ДНК-специфических, которые предпочтительнее связываются с ее дц-структурой.

В настоящее время одним из достижений в области биомедицины и, в основном, диагностики и биотехнологии считается разработка и применение устройств на основе биологического материала – биосенсоров (Carrascosa et al., 2016; Sohradi et al., 2016). В этих устройствах особую роль играет биорецептор, который может быть белком, нуклеиновой кислотой и др. В этой связи, интерес к взаимодействию различных нековалентно связывающихся низкомолекулярных веществ - лигандов с НК в настоящее время возрос. В равной мере важное значение имеют как лиганды-интеркаляторы, так и неинтеркалирующие лиганды, которые могут локализоваться в бороздках НК (как в малой, так и в большой) или связываться с ними с внешней стороны, посредством электростатических взаимодействий. К таким лигандам относятся классический интеркалятор бромистый этидий (БЭ). Взаимодействие этого лиганда с ДНК стало важным для разработки теоретических моделей нековалентного связывания малых молекул с НК, и в настоящее время выявлено, что БЭ обладает мультимодальностью и в зависимости от концентрации, с НК может связываться различными механизмами (интеркаляционным и другими), что лежит в основе влияния этого лиганда на геном и на клетку в целом. Другой лиганд интеркалирующей природы – метиленовый синий (МС). Это соединение имеет широкий спектр биологической и фармакологической активности. МС обладает мощным антиоксидантным свойством, поскольку может блокировать различные окислительные процессы в организме. Более того, в 2018 году было выявлено, что МС может ингибировать активность вируса Эболы и MERS-CoV (ковид вирус) в плазме крови. МС известен также как фотосенсибилизатор.

То же самое можно сказать и для некоторых неинтеркалирующих соединений, среди которых практическое применение получило желобково связывающее соединение Hoechst 33258 (H33258), который также в настоящее время применяется в качестве лекарственного препарата против различных патологий.

Учитывая вышесказанное, можно полагать, что исследование взаимодействия нуклеиновых кислот – и ДНК, и РНК с лигандами приобретает новое научное и прикладное значение в медицинской диагностике, в частности диагностических подходах на основе биосенсоров. В представленной работе как модель двухцепочечной РНК использовался синтетический двухцепочечный полинуклеотид – poly(rA)-poly(rU). Пониманием влияния этих лигандов на генетический материал и на клеточные процессы в целом обусловлена актуальность предлагаемой диссертационной работы.

**Цель и задачи диссертационной работы.** Целью диссертационной работы явилось исследование связывания классического интеркалятора БЭ, интеркалятора МС и желобковосвязывающегося соединения Н33258 с нуклеиновыми кислотами; особенности взаимодействия этих лигандов с poly(rA)-poly(rU), являющейся моделью двухцепочечной РНК, а также изучение термодинамических свойств комплексов НК с этими лигандами.

Для осуществления поставленной цели, в задачи работы входило:

- Разработка кинетической модели, описывающей взаимодействие лигандов с нуклеиновыми кислотами при произвольном заполнении центров адсорбции на матрице (НК);
- Исследование связывания классического интеркалятора БЭ с poly(rA)-poly(rU) в зависимости от ионной силы раствора и определение термодинамических параметров связывания;
- Изучение связывания интеркалятора МС с poly(rA)-poly(rU) в зависимости от ионной силы раствора и определение термодинамических параметров комплексообразования;
- Исследование связывания и термодинамический анализ взаимодействия Н33258 с poly(rA)-poly(rU), а также сравнительное исследование взаимодействия Н33258 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT).

**На защиту выносятся:**

- Кинетическая модель связывания лигандов с НК при малом и произвольном заполнении центров адсорбции на матрице и выяснение влияния лигандов на гибридизацию и изменение выходного сигнала биосенсора или биочипа;
- Экспериментальные данные по взаимодействию БЭ с poly(rA)-poly(rU) в зависимости от ионной силы раствора и влияния конформации НК на сродство БЭ с этим полинуклеотидом;
- Экспериментальные результаты особенностей взаимодействия МС с poly(rA)-poly(rU) и влияния структурного состояния poly(rA)-poly(rU) на способы связывания МС с полинуклеотидом;
- Результаты термодинамических исследований по взаимодействию Н33258 с poly(rA)-poly(rU) и влияния Н33258 на структурные превращения poly(rA)-poly(rU) в зависимости от ионной силы раствора;
- Экспериментальные данные по взаимодействию Н33258 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) в зависимости от ионной силы раствора.

**Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы.** В работе получены результаты по взаимодействию некоторых лигандов с НК, которые отличаются новизной, поскольку выявляют как кинетические особенности связывания различных лигандов с двухцепочечными структурами нуклеиновых кислот, так и выясняют различные аспекты влияния лигандов на структуру НК, а также структурного состояния последней на сродство лигандов с ней. Также выявлено, что на особенности взаимодействия лигандов различной природы влияют ионная сила раствора, конформационное состояние нуклеиновых кислот. Так БЭ с дц-РНК (моделью которой является poly(rA)-poly(rU)) также может связываться интеркаляционным, полунтеркаляционным и электростатическим способами, при этом проявляя некоторую предпочтительность к А-форме НК, так как термодинамические параметры взаимодействия, в том числе – константа К, число нуклеотидов n, приходящих на одно место связывания, а также изменения энтальпии, энтропии и свободной энергии системы БЭ-poly(rA)-poly(rU) указывают на такую

предпочтительность. Полученные результаты подтверждают тот факт, что способы связывания БЭ с НК универсальны и не зависят от условий среды (ионной силы раствора, структуры и конформации НК). Также выявлено, что в случае интеркалятора МС, средство, а также проявление того или иного способа связывания зависят от ионной силы раствора и от структурного состояния НК.

Новизной являются также данные, полученные на основании полного термодинамического анализа комплексообразования желобковых соединений нетропсина и Hoechst с двухцепочечной РНК, который выявил, что специфическое связывание этих лигандов зависит от типа пар оснований и от геометрических особенностей малого желобка НК. При этом было обнаружено, что оба лиганда предпочтительнее связываются с АТ (АУ) парами практически одинаковым механизмом, однако в случае нетропсина это взаимодействие сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время как в случае Hoechst – положительным, однако вклад энтропийного фактора в образовании комплексов более выражен в случае Hoechst. Полученные данные также указывают на то, что ДНК может стать более предпочтительной мишенью для желобковых соединений, чем РНК. Впервые показано, что при взаимодействии H33258 с ДНК главными являются АТ-специфичное связывание в малом желобке, и интеркаляция в GC-богатые участки, в то время как при связывании с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU), при определенных концентрациях этот лиганд вызывает структурный переход полинуклеотидов из двухцепочечного в трехцепочечное состояние.

Практическое значение работы заключается в том, что проведенные пионерские исследования по взаимодействию указанных выше ДНК-специфических лигандов с poly(rA)-poly(rU) позволяют понимать механизмы связывания биологически активных, в том числе, лекарственных препаратов с различными дц-структурами РНК, а также могут стать фундаментальными для модуляции клеточных процессов с помощью различных лигандов. Данные по кинетики взаимодействия лигандов с дц-НК позволят применить их в качестве включателей и выключателей процессов, происходящих с участием одно- или двухцепочечными НК, а также применить различные вещества в технологиях геносенсоров и геночипов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры биофизики ЕГУ и на научных конференциях: International Conversation, Albany USA, 2003; 2009; 2013; 2015; 2019; International Alumni Seminar on «Biotechnology and Health», (Armenia), 2005; 2020; International Conference “Current Problems of Chemical Physics” dedicated to the 50<sup>th</sup> anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA. 9-12 Oct., 2012, Yerevan; International Conference Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior, 27-29 May 2013, Yerevan, Armenia; IV съезд биофизиков России, Сочи 16-21 сентября, 2019.

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 25 научных статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах и 12 тезисов в сборниках материалов международных конференций.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения и шести глав, изложена на 256 страницах. Диссертация содержит 55 рисунков, 11 таблиц и список цитируемой литературы из 328 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обсуждаются цель, актуальность и научное значение, а также описывается структура диссертационной работы.

В первой главе представлены литературные данные по структуре РНК, по механизму работы геносенсоров и взаимодействию малых молекул с НК.

Во второй главе представлены кинетические модели взаимодействия лигандов с НК.

В третьей главе приведены экспериментальные данные по взаимодействию классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ) с poly(rA)-poly(rU), сравнительные исследования с различными НК, а также анализ механизмов связывания мультимодальных лигандов с НК по поведению изобестической точки, оценка параметров связывания БЭ с poly(rA)-poly(rU) и сравнение с данными комплексов БЭ-ДНК.

В четвертой главе приведены данные по взаимодействию интеркалятора метиленового синего (МС) с poly(rA)-poly(rU), а также с poly(dA)-poly(dT). Приведены также сравнительные данные по взаимодействию БЭ и МС с различными двухцепочечными структурами.

В пятой главе представлены экспериментальные результаты по взаимодействию желобкового лиганда Hoechst 332528 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT), а также полный термодинамический анализ комплексообразования.

В шестой главе приведены материалы и методы исследования.

В работе были использованы следующие препараты: синтетические полинуклеотиды poly(rA)-poly(rU), poly(dA)-poly(dT), ДНК тимуса телят (ТТ, среднее ГЦ содержание - 42%), бромистый этидий - БЭ, "Serva" (Германия), метиленовый синий (МС) ("Aldrich", (США)), Hoechst 33258 (H33258), ("Sigma" (США)), HCl, NaOH (ос.ч.), ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Все препараты были ультрачистые и использованы без дополнительной очистки.

Концентрации использованных препаратов определены спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: poly(rA)-poly(rU) -  $\epsilon_{260}=7140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , poly(dA)-poly(dT) -  $\epsilon_{260}=6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; ДНК тимуса телят -  $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , БЭ -  $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Hoechst 33258 -  $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; МС -  $\epsilon_{668}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Исследования проводились при ионных силах раствора -  $\mu=0,02; 0,04; 0,1 \text{ M}$ .

Исследования спектроскопическими методами проводились на спектрофотометрах PVE Unicam-SP8-100 (Англия), UV VIS PerkinElmer Lambda 365 (США), UV/VIS Jenway 6715 (Англия), Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Australia). Спектроскопические измерения осуществлялись в кварцевых кюветтах объемом 3 и 1 мл, длиной оптического пути 1 см.

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

Титрование растворов исследуемых образцов проводили микропипеткой объемом 10  $\mu\text{l}$  фирмы "Hamilton" (США).

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Кинетика связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами.** Проблема связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами (НК) занимает важное место в молекулярной биофизике. Большинство физико-химических реакций в клетке связано с первичным процессом обратимого связывания соответствующих лигандов с НК. При этом, обратимое связывание относят к физической адсорбции, а необратимое связывание – к ковалентному связыванию. Подавляющее большинство лигандов связывается с НК обратимым образом, поэтому возникает необходимость рассматривать кинетику обратимого связывания лигандов с НК. Можно выделить два основных способа связывания лигандов с НК – это интеркаляция и внешнее связывание. Одной из актуальных проблем кинетики связывания лигандов с НК является выяснение связи между структурой мест и скоростью связывания для различных лигандов, информацию о которых можно получить из констант скоростей образования и распада комплекса лиганда со связывающим местом на НК (Gottesman and Storz, 2011; Luso et al., 2011).

Описание связывания лиганда ( $L$ ) с НК ( $M$ ) и распада комплекса можно представить в виде квазихимической реакции:



где  $(LM)$  - комплекс лиганда с НК,  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы скоростей образования и распада комплекса. НК представим в виде одномерного кристалла с  $N$  идентичных центров связывания, а лиганд, имеющий намного меньшие линейные размеры, при адсорбции занимает  $n$  центров на НК, которые будем называть одним местом связывания. Для стохастического описания связывания лиганда с НК вводится функция условной вероятности  $P(x, t/x', t')$  того, что на НК в момент времени  $t$  имеется  $x$  связанных молекул лиганда, при условии, что в предшествующий момент времени  $t'$  на НК было  $x'$  связанных молекул лиганда. Процесс связывания и распада лиганда с НК представляется в виде дискретного марковского процесса, из которого выводится уравнение для абсолютных вероятностей  $w(x, t)$  состояния  $x$  ( $w(x, t)$  - вероятности того, что на НК в момент времени  $t$  имеется  $x$  молекул лиганда. Используя  $w(x, t)$  можно получить уравнение для  $\bar{x}^k$  в виде:

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = k_1 c_f \left( \frac{N - nx}{N - (n-1)x} \right)^n (N - (n-1)x - k_{-1} \bar{x}) \quad (2)$$

где  $c_f$  – концентрация лигандов в растворе. При малых заполнениях уравнение (2) имеет вид

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = -(k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f) \bar{x} + N k_1 c_f \quad (3)$$

Принимая, что в начальный момент времени на НК нет связанных лигандов, т.е. при условии  $x(0)=0$ , легко решить уравнение (3). Можно показать, что это решение имеет вид

$$r(\tau) = \frac{K c_f}{1 + (2n-1)K c_f} (1 - \exp(-(1 + (2n-1)K c_f)\tau)) \quad (4)$$

где  $r = \bar{x}(t)/N$ ,  $\tau = k_{-1} t$ ,  $K = k_1 / k_{-1}$  – константа равновесия при связывании лиганда с НК. Из (4) можно получить стационарное значение для среднего числа

связанных с НК лигандов, которую представим в виде линейной (в координатах Скэтчарда) изотермы связывания лигандов с НК

$$\frac{r}{c_f} = K(1 - (2n - 1)r) \quad (6)$$

Стационарное значение для среднего числа связанных с НК лигандов можно получить из уравнения (2) и оно точно соответствует изотерме Крозерса-Гурского (Pitchiaya et al., 2014; Djebali et al., 2012)

$$\frac{r}{Kc_f} = \left( \frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right)^n (1 - (n - 1)r) \quad (7)$$

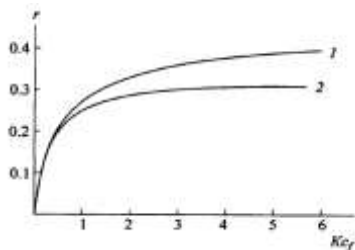


Рис. 1. Изотермы связывания, построенные по точной формуле (7) при произвольном заполнении (кривая 1) и по приближенной формуле (6) при малых заполнениях (кривая 2) для случая  $n=2$ .

Изотермы связывания при произвольном заполнении и при малых заполнениях представлены на рис. 1, из которого видно, что, как и ожидалось, в области малых заполнений приближенная формула хорошо описывает изотерму связывания. Нетрудно показать, что совместный анализ изотермы связывания и кинетики связывания лигандов с НК позволяет определить константы скоростей образования и распада комплекса лиганда с НК -  $k_l$  и  $k_{-l}$ . Для этого вначале из сопоставления экспериментальных и теоретических изотерм (7) (в случае малых заполнений удобно использовать изотерму (6)) определяются  $K$  и  $n$ . После этого, при известных  $K$  и  $n$  из сопоставления теоретических зависимостей кинетики заполнения НК лигандами (2) с соответствующими экспериментальными зависимостями числа связанных лигандов на НК от времени можно определить  $k_{-l}$ , а затем и  $k_l$ , поскольку  $K = k_l/k_{-l}$ . Таким образом, полученные уравнения позволяют определить константы скоростей образования и распада комплекса лиганда с НК с помощью совместного анализа изотермы и кинетики связывания лигандов с НК.

Исследование кинетики связывания лигандов с НК имеет прикладное значение, что связано с тем, что в последние 20 лет в прикладной биологии стали применяться различные типы биосенсоров и биочипов на основе биомолекул (Monaco, 2007; Leungel et al., 2013; Sweeney et al., 2015; Zirbel et al., 2015). Работа геносенсоров (геночипов) основана на гибридизации комплементарных нитей НК. Так, если, например, в растворе есть одноцепочечные ДНК, комплементарные иммобилизованной ДНК, то при их гибридизации образуются дуплексы ДНК. Образование дуплекса активизирует сигнал, который, передается регистрирующему устройству. Величина выходного сигнала ДНК-биосенсора пропорциональна числу ДНК дуплексов. При гибридизации нитей НК (Т) образуется дуплекс НК-ТР (Р - зонд). Далее, на этот дуплекс ДНК адсорбируется интеркалирующий лиганд, образуя комплекс. Рассмотрим часто реализующийся случай медленного связывания мишени



с пробой по сравнению с переносом вещества, т.е. рассмотренная система является пространственно-однородной. При сделанных выше допущениях, связывание мишени Т с пробой Р и распад дуплекса (ТР) можно представить по аналогии с (1). Число иммобилизованных на подложке молекул – зондов равно  $N_0$ . Уравнение, описывающее изменение во времени числа дуплексов ДНК на подложке  $n$ , имеет вид

$$\frac{dn}{dt} = k_h c_i (N_0 - n) - k_d n \quad (8)$$

где  $k_h$  и  $k_d$  – константы скоростей образования и распада дуплекса ДНК, соответственно,  $C_i$  – концентрация мишеней в растворе. Введя безразмерное время  $\tau = k_d t$ , получается следующее уравнение:

$$\frac{dx}{d\tau} = K_i c_i (1 - x) - x \quad (9)$$

$$K_i = k_h / k_d$$

где  $K_i$  – константа равновесия квазихимической реакции. Далее, рассмотрим важный для практики случай, когда лиганды, при адсорбции, интеркалируют в ДНК-дуплексы. Число ДНК-дуплексов в произвольный момент времени равно  $n(t)$ . Примем, что число мест интеркаляции на одном дуплексе равно  $N$ . Тогда изменение во времени полного числа лигандов  $y$ , с начальными условиями  $x(0)=0$  и  $y(0)=0$  описывает согласованное изменение как числа ДНК-дуплексов на подложке, так и числа адсорбированных на дуплексах ДНК молекул лигандов. С учетом начального условия  $x(0)=0$  получается:

$$x(\tau) = (1 - \tau_i)(1 - \exp(-\tau / \tau_i)) \quad (10)$$

где  $\tau_i = \frac{1}{1 + K_i c_i}$  – время релаксации мишеней, гибридизующихся на поверхности ДНК

– сенсора.

В стационарном состоянии изотермы образования дуплексов на подложке и связывания лигандов с дуплексами ДНК имеют лэнгмюровский вид

$$n = \frac{N_0 K_i c_i}{1 + K_i c_i} \quad (11)$$

$$m = \frac{N_0 N K_i c_i K_i c_i}{(1 + K_i c_i)(1 + K_i c_i)} \quad (12)$$

Кинетика заполнения подложки дуплексами ДНК имеет экспоненциальный вид и представлена на рис. 2.

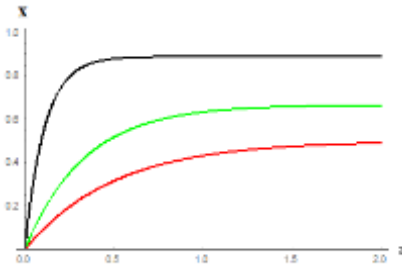


Рис. 2. Кинетика заполнения подложки ДНК-дуплексами в безразмерных координатах ( $\tau = k_d t$  – безразмерное время,  $x = n/N_0$  – степень гибридизации). Параметром на кривых является безразмерная концентрация  $K_i c_i$ , равная 8, 2, 1 сверху вниз.

На малых временах  $x(\tau) \sim K_i c_i \tau$  и скорость заполнения подложки ДНК-дуплексами пропорциональна как константе равновесия  $K_i$ , так и концентрации мономеров ДНК в

растворе  $C_l$ . На рис. 3 видно, что время выхода числа ДНК-дуплексов на подложке на стационарный уровень уменьшается с увеличением как константы равновесия  $K_l$ , так и концентрации мишеней в растворе  $C_l$ .

Кинетика заполнения ДНК-дуплексов интеркалирующими лигандами представлена на рис. 3, из которого видно, что вид кривой зависит от соотношения между коэффициентами диссоциации ДНК-дуплекса и коэффициентами диссоциации комплекса ДНК-дуплекса с лигандом.

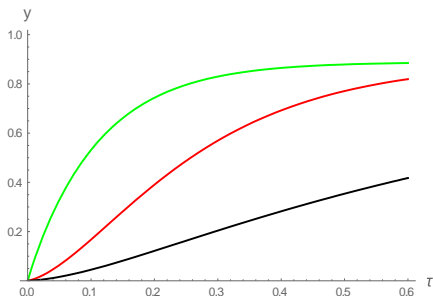


Рис. 3. Кинетика заполнения ДНК-дуплексов лигандами (11) в безразмерных координатах ( $\tau = k_d t$  – безразмерное время,  $y = m/NN_0$  – степень адсорбции лигандов). Параметр на кривых -  $k_d/k_{-d}$ , равен 0.1, 1.6, 7 сверху вниз. На всех кривых  $K_l C_l = 8$ .

Чем меньше отношение коэффициента диссоциации ДНК-дуплекса к коэффициенту диссоциации комплекса ДНК-дуплекса с лигандом тем ближе форма кривой к экспоненте.

**Связывание классического интеркалятора бромистого этидия с poly(rA)-poly(rU). Влияние ионной силы раствора.** Одним из широко распространенных классических интеркаляторов является бромистый этидий (БЭ), который, к тому же, проявляет мультиформальность при взаимодействии с НК. Учитывая, что в клетке РНК находится в различных структурных, в том числе, двухцепочечном (дц-) состояниях, весьма важным могут стать исследования по взаимодействию БЭ с дц-РНК, в качестве модели которой служит poly(rA)-poly(rU). При функционировании как ДНК, так и РНК могут проявить структурное многообразие, что представляет определенный интерес с точки зрения понимания их биологической роли. При этом, если при функционировании ДНК из двухцепочечного (дц-) переходит в одноцепочечное (оц-) или, редко, в четырехцепочечное (квадруплексное) состояние, то РНК может принимать более разнообразные формы. В частности, синтетический гомополинуклеотид poly(rA)-poly(rU), хотя и является хорошей моделью дц-РНК, может перейти в трехцепочечную структуру, когда poly(rA) и poly(rU) отделяются друг от друга и poly(rU) связывается с дуплексом, а poly(rA), при нейтральных рН остается в оц-состоянии, а при низких значениях рН самоассоциирует с образованием дц-структуры. Тем не менее, при стандартных условиях (комнатных температурах, в физиологическом растворе, в присутствии только одновалентных катионов) основной является двухцепочечная форма. Однако, увеличение ионной силы раствора или добавление двух- или поливалентных катионов может приводить к сдвигу дуплексной формы poly(rA)-poly(rU) к смеси триплексной и одноцепочечной форм. Этот факт необходимо учитывать при исследованиях особенностей poly(rA)-poly(rU) как модели дц-РНК, которая имеет важное функционально-модулирующее влияние на процессы жизнедеятельности клетки.

Учитывая важность дц-формы РНК в контроле генной экспрессии, нами проводилось плавление poly(rA)-poly(rU) и его комплексов с БЭ в присутствии

одновалентных катионов  $\text{Na}^+$ , при ионных силах раствора 0,02; 0,04 и 0,1 М. Данные по плавлению выявляют, что poly(rA)-poly(rU) имеет нестабильную структуру в дц-состоянии, как и РНК. В частности, при ионной силе раствора 0,02 М, при комнатной температуре и нейтральных значениях рН, этот полинуклеотид находится в частично расплавленном состоянии (рис. 4, кривая 1).

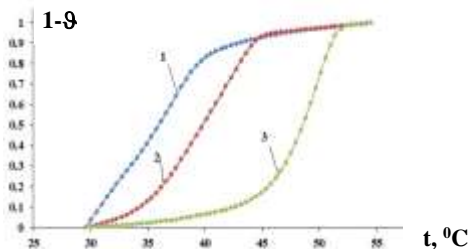


Рис. 4. Кривые плавления poly(rA)-poly(rU) при ионных силах 0.02 (1); 0.04 (2) и 0.1 М (3).

При более высоких ионных силах наблюдается стабилизация дц-структуры. Неожиданным оказался тот факт, что poly(rA)-poly(rU), по сравнению с его дезоксианалогом, плавится в необычно широком температурном интервале – примерно  $\Delta T \approx 10\text{--}15^\circ\text{C}$  при ионных силах 0.02 и 0.04 М и  $\Delta T \approx 8\text{--}10^\circ\text{C}$  – при 0.1 М. Большое значение  $\Delta T$  обычно свойственно ДНК с квазислучайной последовательностью нуклеотидов и обусловлено гетерогенностью стекинг взаимодействий между парами оснований. В случае синтетических дезоксигомополинуклеотидов гетерогенность стекинга небольшая ( $\Delta T \approx 0.5\text{--}1^\circ\text{C}$ ), поэтому, высокое значение  $\Delta T$  poly(rA)-poly(rU) трудно объяснить с этой точки зрения (Nguen et al., 2009). Поскольку кривые плавления poly(rA)-poly(rU) и его комплексов с БЭ гладкие, мы полагаем, что, при изменении ионной силы раствора в интервале  $0,02 \leq \mu \leq 0,1$  М, в присутствии  $\text{Na}^+$ , имеет место только переход из дц- в оц-состояние, т.е. трехцепочная или структуры более высокого порядка не образуются. Из полученных кривых плавления определены значения параметров плавления – величины температуры плавления  $T_m$  и ширины интервала перехода  $\Delta T$ , а также  $\delta T_m$  и  $\delta \Delta T$ , и построены их зависимости от  $r$  ( $r = \text{лиганд/НК}$ ), которые приведены на рис. 5.

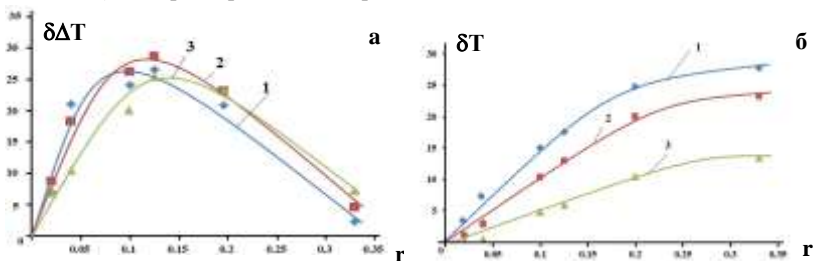


Рис. 5. а – Кривые зависимости  $\delta \Delta T$  от  $r$ , полученные при ионных силах 0.02 (1); 0.04 (2) и 0.1 М (3). б - кривые зависимости  $\delta T_m$  от  $r$ , полученные при ионных силах 0.02 (1); 0.04 (2) и 0.1 М (3).

Кривые зависимости  $\delta\Delta T$  от  $\tau$  (рис. 5 а) комплексов БЭ с дц-poly(rA)-poly(rU) колоколообразные, поскольку возрастают при низких концентрациях лиганда и, проходя через максимум, уменьшаются. При этом, кривые 1-3 сдвинуты друг относительно друга. С другой стороны, максимум кривой 2 больше максимумов кривых 1 и 3. На рис. 5 б приведены кривые зависимости  $\delta T_m$  от  $\tau$ . Из этого рисунка видно, что величина изменения  $\delta T_m$  от  $\tau$  уменьшается по мере увеличения ионной силы раствора. Обобщая приведенные результаты мы заключаем, что БЭ взаимодействует с дц-формой этого полинуклеотида мультимодально, что проявляется в виде колоколообразных кривых зависимостей  $\delta\Delta T$  от  $\tau$  (рис. 5). Поскольку величина  $\delta\Delta T$  от  $\tau$  (кривая 2), полученная при ионной силе раствора 0,04 М больше, чем при ионных силах 0,02 и 0,1 М (кривые 1 и 3), то очевидно, что увеличение ионной силы раствора от 0,02 до 0,04 М приводит к расширению ширины интервала плавления комплексов БЭ с дц-poly(rA)-poly(rU). При дальнейшем же увеличении этого фактора  $\Delta T$  уменьшается. В то же время, изменение  $T_m$  при увеличении концентрации БЭ существенно зависит от ионной силы раствора и при ее увеличении стабилизирующее влияние БЭ на дц-структуру poly(rA)-poly(rU) монотонно уменьшается (рис. 5 б). Полученные данные указывают на то, что poly(rA)-poly(rU) находится в стабильном дц-состоянии при условии  $\mu > 0,02$  М в отсутствие БЭ. Комплексообразование полинуклеотида с лигандом приводит к сдвигу равновесия структуры в сторону дц-формы. При этом, несмотря на то, что наибольшее влияние БЭ на стабилизацию дц-структуры полинуклеотида выявляется при ионной силе 0,02 М, тем не менее этот лиганд, предпочтительнее связывается с дц-poly(rA)-poly(rU) при ионной силе 0,04 М. С последующим увеличением ионной силы раствора ширина интервала плавления комплексов БЭ при соответствующих значениях  $\tau$  уменьшается, что находится в соответствии с аналогичными данными, полученными для комплексов БЭ-дц-ДНК (Degtyareva et al., 2007). Эти данные указывают на то, что poly(rA)-poly(rU) имеет необычные свойства, которые по всей вероятности и обуславливают его взаимодействие с различными соединениями. Также можно констатировать, что БЭ сохраняет присущее ему свойство мультимодального связывания с дц-формой НК.

Нами проведено также сравнительное изучение связывания классического интеркалятора БЭ с poly(rA)-poly(rU); poly(dA)-poly(dT), poly[d(A-T)]- poly[d(A-T)] и ДНК, при ионной силе раствора 0,02 М. Зависимости  $\delta T_m$  от  $\tau$  (кривые схожи с теми же на рис 5 б, и не приводятся), полученные для различных НК выявляют, что наибольшее изменение температуры плавления получается при связывании БЭ с дц-poly(rA)-poly(rU) (А-форма), а наименьшее – при связывании с ДНК (В-форма). В случае структурного аналога poly(rA)-poly(rU) - poly(dA)-poly(dT) (В'-форма) изменение  $T_m$  также больше, чем в случае ДНК, несмотря на то, что этот полинуклеотид и ДНК принадлежат к В-семейству нуклеиновых кислот. В то же время, проявляется также некоторое различие и в значениях  $\delta T_m$ , полученных для комплексов БЭ poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], по сравнению с комплексами БЭ-poly(dA)-poly(dT). Полученные данные выявляют, что БЭ, связываясь с одними и теми же механизмами с различными НК, проявляет некоторую специфичность к той или иной структуре НК. полученные данные выявили, что в ряду poly(rA)-poly(rU); poly(dA)-poly(dT) poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] и ДНК, БЭ наибольшее предпочтение проявляет к полинуклеотиду, принадлежащему к А-семейству – дц-poly(rA)-poly(rU). С этой точки зрения, дц-ДНК является наименее предпочтительной, несмотря на то, что она имеет

большую конформационную подвижность, чем poly(rA)-poly(rU), а также poly(dA)-poly(dT).

### Спектроскопическое исследование взаимодействия БЭ с poly(rA)-poly(rU).

Комплексообразование БЭ с poly(rA)-poly(rU) изучалось спектрофотометрически при ионных силах 0,02; 0,04 и 0,1 М. Спектры поглощения БЭ и его комплексов с указанным полинуклеотидом приведены на рис. 6, полученные при ионной силе раствора 0,04 М (схожие спектры получены и при других ионных силах), при  $t=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}\sim 7,0$ .

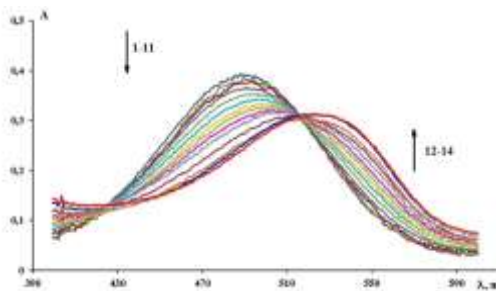


Рис. 6. Спектры поглощения БЭ (кривая 1) и его комплексов с poly(rA)-poly(rU) (кривые 2-14). Ионная сила раствора 0,04 М,  $\text{pH}\sim 7,0$ . Аналогичные спектры получены при ионной силе раствора 0.1 М (спектры не приведены).

Увеличение концентрации полинуклеотида в растворе при фиксированной концентрации БЭ, в результате комплексообразования приводит к уменьшению спектров поглощения в максимумах (гипохромизм), при  $\lambda=480$  нм, а также к длинноволновому сдвигу (батохромный сдвиг). Гипохромный эффект составляет ~60% (кривые 1-11), батохромный сдвиг - примерно 40 нм (кривые 12-14). На спектрах комплексов БЭ-poly(rA)-poly(rU) при  $\lambda=515$  нм образуется изобестическая точка (ИТ) как и при связывании этого лиганда с дц-ДНК (Bo et al., 2011). Поскольку ИТ на спектрах образуется при относительно высоких концентрациях лиганда, при которых БЭ связывается с НК более чем одним способом, то мы полагаем, что свободные и связанные молекулы БЭ, имеющие различные оптические характеристики, в этой точке при  $\lambda=515$  нм проявляют одинаковое поглощение. При концентрациях  $C_p \gg C_0$ , где  $C_p$  – концентрация фосфатных групп НК,  $C_0$  – тотальная концентрация БЭ, спектры поглощения отклоняются от изобестической точки (кривые 12-14) и увеличиваются в максимумах, что является следствием того, что все молекулы БЭ переходят в практически полностью связанное состояние (интеркалированы в плоскость между парами оснований). Этот факт позволяет проводить количественный анализ изменений спектров поглощения и рассчитать концентрации связанных и свободных молекул лиганда и на их основании оценить величину константы связывания лиганда с макромолекулами.

Получены также спектры флуоресценции БЭ и его комплексов с poly(rA)-poly(rU), представленные на рис. 7, которые указывают на то, что относительная интенсивность флуоресценции лиганда возрастает по ходу комплексообразования с дц-полинуклеотидом (кривые 1-29), при увеличении концентрации последнего в растворе.

При этом, имеет место также небольшой гипсохромный сдвиг. Отметим, что возбуждение БЭ осуществлялось при  $\lambda=480$  нм, спектры флуоресценции получены в интервале  $550 \leq \lambda \leq 800$  нм, как и при абсорбционных измерениях, концентрация БЭ в растворе оставалась постоянной, концентрация полинуклеотида увеличивалась, до

соотношений, при которых относительная интенсивность флуоресценции больше не менялась.

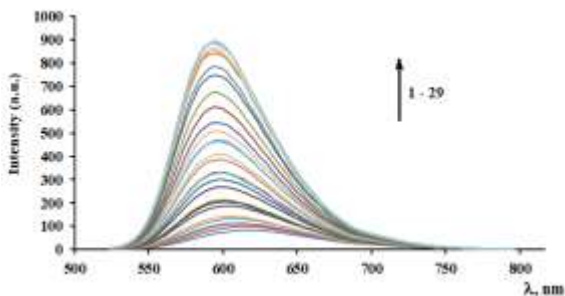


Рис. 7. Спектры флуоресценции БЭ (кривая 1) и его комплексов с дц-poly(rA)-poly(rU) (кривые 2-29). Ионная сила раствора 0,04 М, рН≈7,0. Аналогичные спектры получены при ионной силе раствора 0.1 М

Изменение спектров флуоресценции комплексов БЭ-poly(rA)-poly(rU), как и в случае ДНК, указывает на интеркаляцию этого лиганда в дц-спираль этого полинуклеотида. Ароматические кольца БЭ, внедряясь в плоскость между парами оснований, экранируются от водно-солевого растворителя (полярного растворителя, являющийся активным тушителем), вследствие чего интенсивность флуоресценции этих молекул лиганда возрастает, в то время как интенсивность флуоресценции неинтеркалированных (свободных или связанных иными способами) молекул остается небольшой. Фактически, полученные данные подтверждают тот факт, что БЭ может также интеркалировать в спирали НК А-типа. На основании данных по поглощению и флуоресценции БЭ и БЭ-poly(rA)-poly(rU) комплексов проведен анализ, для построения изотерм адсорбции в координатах Скетчарда. При этом, кривые связывания в координатах Скетчарда, которые являются наиболее информативными при оценках параметров связывания, в большинстве случаев не прямолинейные, что является или результатом антикооперативного связывания лиганда, или существованием более одного типа связывания. В последнем случае возникает необходимость линеаризации не прямолинейных изотерм адсорбции. Обычно кривые связывания в координатах Скетчарда строятся по следующей формуле, при кооперативном связывании лигандов с НК:

$$r/C_f = K(1-nr) \left[ \frac{(2\omega-1)(1-nr) + r - R}{2(\omega-1)(1-nr)} \right] \left[ \frac{1-(n+1)r + R}{2(1-nr)} \right]^2, \quad (13)$$

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

где  $\omega$  - фактор кооперативности ( $\omega > 1$ , взаимодействие кооперативное,  $\omega < 1$  - взаимодействие антикооперативное),  $r$  - число лигандов, приходящих на одно место связывания,  $C_f$  - концентрация несвязанных молекул лиганда. В случае отсутствия кооперативности (антикооперативности)  $\omega \approx 1$ , поэтому кривые связывания строятся по следующей формуле:

$$r/C_f = K(1-nr) \left[ \frac{1-nr}{1-(n-1)r} \right]^{n-1} \quad (14).$$

Эта кривая имеет непрямолинейный ход в случае двух или больше способов связывания, поэтому, для более точной оценки отдельных способов эти кривые линеаризуются по следующей формуле.

$$\frac{r}{c_f} = K(1 - (2n - 1)r) \quad (15)$$

Для получения координат Скетчарда ( $r$  и  $r/C_f$ ), из спектров поглощения и флуоресценции определены концентрации свободных ( $C_f$ ) и связанных ( $C_b$ ) молекул лиганда, а также  $r$  ( $r=C_b/C_p$ ,  $C_p$  – концентрация фосфатных групп НК) и  $r/C_f$ , и построены изотермы адсорбции БЭ на дц-poly(rA)-poly(rU) – зависимость  $r/C_f$  от  $r$ . Изотермы адсорбции, полученные на основании абсорбционных данных, при ионных силах 0,02; 0,04 и 0,1 М, не прямолинейные, в противоположность линейным кривым, полученным из флуоресцентных данных (рис. 8). Непрямолинейная изотерма адсорбции линеаризована по формуле 15. Необходимо отметить, что с poly(rA)-poly(rU) БЭ также образует по крайней мере три типа комплексов, как и с двухцепочечной (дц-) ДНК. Для этих комплексов определены значения  $K$  и  $n$ . Примечательно, что значения  $K$  и  $n$ , оцененные при ионной силе раствора 0,04 М, при которой poly(rA)-poly(rU) находится в стабильном двухцепочечном состоянии, находятся в хорошем соответствии с аналогичными значениями, полученными для комплексов БЭ с дц-ДНК, что позволяет нам заключить, что с дц-РНК БЭ также взаимодействует интеркаляционным, полунтеркаляционным и электростатическим механизмами. При этом, при увеличении ионной силы раствора от 0,02 до 0,04 М, значения констант связывания БЭ poly(rA)-poly(rU) указанными способами возрастают, затем начинают уменьшаться.

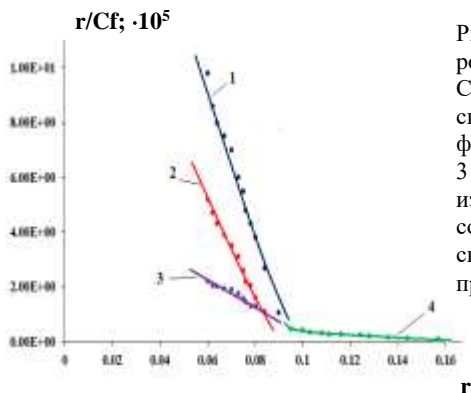


Рис. 8. Кривые связывания БЭ с poly(rA)-poly(rU) в координатах Скетчарда, полученные из спектров поглощения (1) (рис. 6) и флуоресценции (2) (рис.7). Кривая 3 получена вычитанием кривой 2 из кривой 1, кривая 4 соответствует слабому способу связывания БЭ с полинуклеотидом при pH=7,0, t=25 °C,  $\mu=4 \cdot 10^{-2}$  М.

Очевидно также, что возрастание значений  $K$ , при увеличении ионной силы раствора от 0,02 до 0,04 М, обусловлено стабилизацией дц- структуры poly(rA)-poly(rU), однако, дальнейшее увеличение ионной силы до 0,1 М приводит к установлению такой структуры полинуклеотида, которая становится более компактной и менее доступной для вклинивания молекул БЭ в межнуклеотидное пространство. Аналогично, электростатическое взаимодействие также уменьшается при увеличении ионной силы до 0,1 М, что более чем ожидаемо, поскольку имеет место конкуренция за связывание ионов  $Na^+$  положительно заряженными ионами БЭ. Значения  $n$ , оцененные для сильных комплексов, указывают на то, что при сильном способе связывания БЭ с НК ограничены. Очевидно, что наиболее доступными для интеркаляции центры в poly(rA)-poly(rU) реализуются при ионной силе 0,04 М, в то время как при 0,02 и 0,1 М количество центров для интеркаляции уменьшается.

Однако значения  $n$ , с этой точки зрения, при электростатическом способе связывания одинаковые и фактически этот параметр не зависит от ионной силы раствора.

Таким образом, из полученных данных мы заключаем, что в интервале изменения ионной силы раствора  $0,02 \leq \mu \leq 0,10$  М структура poly(rA)-poly(rU) претерпевает определенные изменения, из метастабильной формы переходя в более стабильное дц-состояние. С другой стороны, полученные данные указывают на то, что этот полинуклеотид в условиях относительно низких ионных сил раствора ( $\mu \leq 0,1$  М) не переходит в трехцепочечное состояние в присутствии одновалентных катионов. Другой важный результат заключается в том, что дц-РНК также может проявлять высокое сродство к дц-ДНК специфическим лигандам, а указанные лиганды, при взаимодействии с дц-РНК проявить присущие им способы. В частности, механизмы связывания БЭ фактически не зависят как от ионной силы раствора, так и от типа нуклеиновой кислоты в двухцепочечном состоянии.

**Сравнительное исследование особенностей связывания бромистого этидия и метиленового синего с poly(rA)-poly(rU).** Проведено исследование по взаимодействию МС с poly(rA)-poly(rU) методом УФ-плавления и на основании экспериментальных данных определены значения температуры перехода  $T_m$ , ширины интервала перехода  $\Delta T$ , их изменения -  $\delta(\Delta T)$  и  $\delta(T_m)$ , при ионных силах раствора 0,02; 0,04 и 0,1 М, которые представлены на рис. 9.

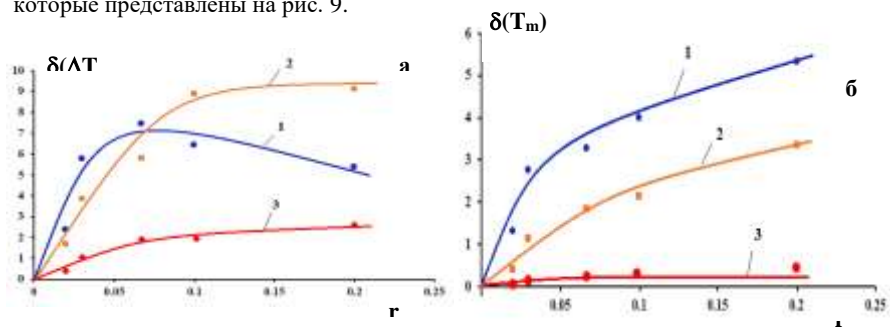


Рис. 9. Кривая зависимости  $\delta(\Delta T)$  (а) и  $\delta(T_m)$  (б) от  $g$  комплексов МС с poly(rA)-poly(rU) при ионных силах раствора 0,02 (1); 0,04 (2) и 0,1 (3) М.

Как видно из приведенных рисунков, при ионных силах раствора 0.04 и 0.1 М зависимости  $\delta(\Delta T)$  от  $g$  схожи, несмотря на то, что их величины существенно отличаются. При ионной силе же раствора 0.02 М кривая стремится к колоколообразному виду, что было выявлено и в случае взаимодействия МС с дц-ДНК. Полученные данные выявляют также, что эффект уширения интервала плавления комплексов poly(rA)-poly(rU) с указанным лигандом больше при ионной силе раствора 0.04 М. Очевидно, что в этих условиях poly(rA)-poly(rU) находится уже в стабильной дц-форме, при этом, структурное состояние наиболее благоприятное для связывания МС с присущими этому лиганду способами. Тем не менее, в случае БЭ мультимодальность сохраняется вне зависимости от ионной силы раствора, в то время как в случае МС взаимодействие значительно ослабляется при увеличении ионной силы. Этот эффект особенно выражено отражается на температуре плавления комплексов, изменение которой от  $g$  существенно зависит от ионной силы раствора и



при  $\mu=0.1\text{M}$   $T_m$  фактически не изменяется в зависимости от возрастающей концентрации МС.

Проведен термодинамический анализ взаимодействия БЭ и МС с poly(rA)-poly(rU) и выявлено, что значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  комплексов БЭ с poly(rA)-poly(rU) возрастают с увеличением ионной силы раствора:  $\Delta H$  увеличивается от  $\sim 5.5$  ккал/моль до  $13.2$  ккал/моль,  $\Delta S$  – от  $18$  ккал/моль·К до  $41$  ккал/моль·К. В случае МС  $\Delta H$  и  $\Delta S$  возрастают при увеличении ионной силы раствора от  $0,02$  до  $0,04$  М, в результате перехода poly(rA)-poly(rU) из метастабильного в стабильное дц- состояние:  $\Delta H$  увеличивается от  $3.5$  до  $14.1$  ккал/моль, а  $\Delta S$  - от  $11$  до  $45$  ккал/моль·К. При последующем увеличении ионной силы раствора от  $0,04$  до  $0,1$  М наблюдается обратная картина: уменьшение значений этих параметров: величина  $\Delta H$  составляет  $8.7$  ккал/моль,  $\Delta S$  –  $27$  ккал/моль·К. Очевидно, что в случае БЭ предпочтительность к нестабильной или стабильной дц-форме не так выражена, как в случае МС, что указывает на то, что этот лиганд может проявить селективность к структурным формам НК. Указанные особенности комплексов дц-poly(rA)-poly(rU) с БЭ и МС выявляются и из спектроскопических исследований, несмотря на то, что изменения спектральных и флуоресцентных свойств обоих лигандов при связывании с дц-ДНК и poly(rA)-poly(rU) фактически одинаковы (спектры не приводятся). Этот факт, скорее всего, указывает на универсальность оптических или флуоресцентных свойств БЭ и МС в связанном с дц-НК состоянии, несмотря на их принадлежность к дезоксирибо- или рибонуклеиновым кислотам. Однако, в случае БЭ спектральные изменения позволили проводить количественный анализ, рассчитать долю связанных и свободных молекул лиганда и на их основании построить кривые связывания при вышеуказанных ионных силах раствора. Из полученных результатов выявляется, что один из способов связывания БЭ с poly(rA)-poly(rU) является достаточно сильным и значительно превалирует над вторым –  $K_1/K_2 \approx 50\div 60$ . При сопоставлении результатов УФ-плавления, спектроскопических исследований и результатов термодинамического анализа, а также литературных данных, можно заключить, что БЭ с poly(rA)-poly(rU) может взаимодействовать более чем двумя способами, причем один или больше типов связывания скрываются под сильным. В случае же МС, хотя и изменения спектров поглощения и флуоресценции при комплексообразовании с poly(rA)-poly(rU) схожи с аналогичными изменениями, имеющими место при взаимодействии этого лиганда с ДНК, тем не менее их количественный анализ не позволяет рассчитать долю связанных и свободных молекул лиганда, следовательно, определить параметры связывания. Поэтому, основываясь на результаты УФ-плавления комплексов МС-дц-poly(rA)-poly(rU) и на термодинамические величины мы заключаем, что МС более выраженно проявляет селективность к типу нуклеиновой кислоты – РНК или ДНК (предпочтительнее связывается с дезоксирибонуклеотидами), что также зависит от ионной силы раствора.

Таким образом, полученные данные выявляют, что poly(rA)-poly(rU) имеет относительно нестабильную структуру при ионных силах  $\mu \leq 0.02$  М, что обуславливает сродство различных лигандов с этим полинуклеотидом. В частности лиганды-интеркаляторы, связывающиеся с дц-ДНК с высоким сродством, также могут связываться и с poly(rA)-poly(rU), однако их взаимодействие зависит от структурного состояния этого полинуклеотида и более предпочтительнее в условиях, при которых poly(rA)-poly(rU) не только находится в дц-состоянии, но и доступна для их интеркаляции. Этот факт особенно выражен в случае с МС, который, являясь интеркалятором, тем не менее не всегда связывается с НК этим способом. В

частности, сродство МС к poly(rA)-poly(rU) к ДНК уменьшается при относительно больших ионных силах, при которых молекулы НК переходят в более плотноупакованное состояние. Очевидно, что этот лиганд может полностью интеркалировать в ДНК или РНК в том случае, когда их спираль раскручена. Этот факт позволяет нам заключить, что МС может стать хорошим маркером в геносенсорных технологиях, поскольку изменением ионной силы раствора можно модулировать особенности связывания этого лиганда с НК. С другой стороны, в случае БЭ вышеуказанный эффект менее выражен, что делает его более универсальным как в качестве зонда в геносенсорных технологиях, так и при модулировании особенностей взаимодействия мультимодальных лигандов с НК.

### **Взаимодействие МС с синтетическим полинуклеотидом poly(dA)-poly(dT).**

Одним из подходов для выявления специфичности низкомолекулярных соединений к определенным нуклеотидам является изучение взаимодействия лигандов с синтетическими полинуклеотидами с заданной последовательностью. С этой точки зрения, одним из подходящих является синтетический полинуклеотид poly(dA)-poly(dT), принадлежащий В-семейству нуклеиновых кислот. Этот полинуклеотид при низкой концентрации соли и высокой относительной влажности волокон имеет структуру типичной В'-ДНК. В растворе этот полинуклеотид более гидратирован, чем poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] или ДНК. Это единственный случай, когда структурные характеристики poly(dA)-poly(dT) в волокнах и в растворе полностью совпадают. У этого полинуклеотида на каждый виток спирали приходится  $10.1 \pm 0.1$  пар оснований, к тому же спираль poly(dA)-poly(dT) не переходит в другие структурные формы. В частности, уменьшение активности воды при добавлении этанола в раствор не вызывает конформационного перехода из В- в А- форму, как в случае poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] или ДНК. У poly(dA)-poly(dT) особый спектр кругового дихроизма (КД) и этот полинуклеотид не образует нуклеосом при взаимодействии с гистоновыми октамерами. У этого полинуклеотида малая бороздка более узкая и молекула в целом имеет более жесткую структуру, чем В-ДНК. С другой стороны, poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)] имеет схожую с ДНК структуру, при этом, в большинстве случаев при взаимодействии лигандов с этим полинуклеотидом проявляются те же особенности, что и при связывании с ДНК. Взаимодействие МС с poly(dA)-poly(dT) исследовалось методом абсорбционной спектроскопии, что основано на том, что по ходу комплексообразования имеет место изменение в спектрах поглощения - уменьшение в максимумах и сдвиг в сторону длинных волн. При этом учитывая, что НК не поглощают в области 300-800 нм, очевидно, что изменения в спектрах обусловлены спектральными различиями свободных и связанных молекул лигандов. Это позволяет проводить количественный анализ и получить экспериментальные значения различных величин, в частности константы связывания  $K$  и числа нуклеотидов  $n$ , приходящих на одно место связывания лиганда.

Получены спектры поглощения комплексов МС с poly(dA)-poly(dT) (рис. 10 а), из которого видно, что как и в случае poly(rA)-poly(rU) или ДНК (Laubenbacher et al., 2009), спектры комплексов проявляют тенденцию к уменьшению в максимумах при длине волны 664 нм относительно спектра лиганда в отсутствие полинуклеотида и сдвигу в длинноволновую область примерно на 3-5 нм (кривые 1-11, где кривая 1 соответствует спектру поглощения МС).

Этот эффект обусловлен ограничением движений молекул красителя в комплексе с нуклеиновыми кислотами и неспособностью образования водородных связей с молекулами воды, что приводит к уменьшению их способности поглощать

энергию света. Близкое расстояние между электронными состояниями хромофорной части МС и оснований НК снижает также вероятность  $\pi$ - $\pi^*$  перехода. Однако, если в случае ДНК, а также poly(rA)-poly(rU) в спектрах образуется псевдоизобестическая точка (см. [49,50]), то в спектрах, полученных для комплексов МС-poly(dA)-poly(dT), такая

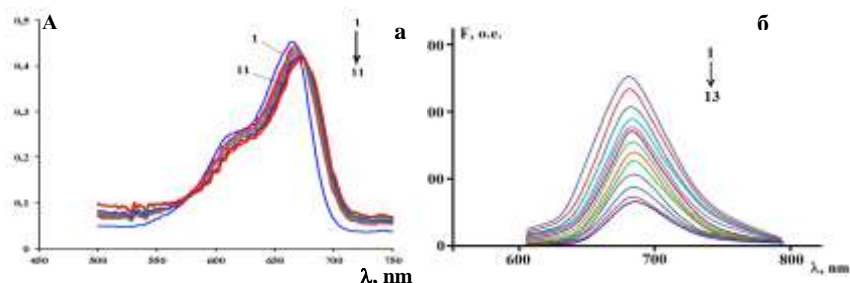


Рис. 10. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) комплексов МС с poly(dA)-poly(dT) (кривые 1 соответствуют спектру поглощения МС), при ионной силе раствора 20 мМ, рН=6.9, t=25 °С.

точка не обнаруживается. Образование псевдоизобестической точки в спектрах комплексов МС с НК является результатом проявления интеркаляционного механизма связывания. Однако, отсутствие этой точки нельзя считать критерием связывания лигандов с НК неинтеркаляционным механизмом, поскольку общие изменения спектров комплексов МС-poly(dA)-poly(dT) и МС-poly(rA)-poly(rU) или ДНК схожи. Этот факт указывает на то, что оптические характеристики, связанных с различными полинуклеотидами молекул МС, почти одинаковы. Гипохромизм и батохромный сдвиг спектров МС в комплексе с АТ (АУ) последовательностями (а также с дц-ДНК) на 3-5 нм указывают на то, что образуется двухкомпонентная система, состоящая из связанных и свободных молекул красителя при установлении равновесия в растворе. При этом можно констатировать, что при низких отношениях НК/лиганд (<4) связывание происходит за счет электростатического взаимодействия между молекулами МС и отрицательно заряженными фосфатными группами НК, при высоких отношениях (>10), за счет интеркаляционного механизма связывания красителя с нуклеиновыми кислотами. Однако, отсутствие изобестической точки может быть результатом того, что полная интеркаляция молекул МС в случае poly(dA)-poly(dT) скорее отсутствует.

Получены также спектры флуоресценции комплексов МС-poly(dA)-poly(dT) в диапазоне изменения длины волны 600-700 нм (возбуждение осуществлялось длиной волны 610 нм) (рис. 10. б). Максимумы спектров флуоресценции МС и его комплексов с poly(dA)-poly(dT) соответствуют длине волны 682 нм. По мере комплексообразования МС с poly(dA)-poly(dT), как и в случае с дц-ДНК и poly(rA)-poly(rU), имеет место уменьшение максимумов спектров флуоресценции при 682 нм, без заметного сдвига в длинно- или коротковолновую область (кривая 1 соответствует

спектру флуоресценции МС). Фактически МС флуоресцирует в той же области (при  $\lambda=682$  нм), в которой поглощает (при  $\lambda=664$  нм). Этот факт можно объяснить тем, что энергия возбуждения при переходе электронов в невозбужденное стационарное состояние в основном излучается в виде света с небольшими потерями. Уменьшение интенсивности флуоресценции вследствие образования комплексов МС с полинуклеотидом обусловлено изменениями среднего локального окружения хромофорной группы красителя. Этот эффект может быть результатом стекинг взаимодействий ароматического хромофора красителя внутри гидрофобного окружения НК, поскольку именно в этом случае возможно снижение частоты столкновений связанных молекул лиганда с молекулами растворителя. С другой стороны, тушение флуоресценции связанных с poly(dA)-poly(dT) молекул красителя, скорее всего не происходит за счет передачи энергии, поскольку электронное поглощение нуклеиновыми кислотами имеет место при более коротких длинах волн в отношении полос эмиссии красителя (Thevenot et al., 2001, Cavalcanti et al., 2009). При этом, важную роль играет также то, что степень гидратированности poly(dA)-poly(dT) больше по сравнению с ДНК и poly(rA)-poly(rU), что является дополнительным фактором тушения флуоресценции. На основании этого мы полагаем, что МС с poly(dA)-poly(dT) связывается по принципу неполной интеркаляции (полуинтеркаляции), вследствие чего и имеет место тушение флуоресценции, поскольку хромофорная группа лиганда в этом случае становится доступной для тушителей (молекул воды и растворенного кислорода). На это указывает и тот факт, что в случае БЭ или АО (которые полностью интеркалируют в ДНК), интенсивность флуоресценции значительно увеличивается. На основании данных спектральных исследований построена кривая связывания МС с poly(dA)-poly(dT), которая не прямолинейная (рис 11).

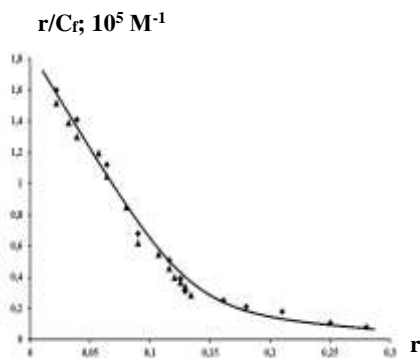


Рис. 11. Кривая связывания МС с poly(dA)-poly(dT) в координатах Скетчарда, полученная из спектров флуоресценции и поглощения при ионной силе раствора 20 мМ, рН=6.9, t=25 °С.

- ♦ точки получены на основании спектров поглощения.
- ▲ точки получены на основании спектров флуоресценции.

Основываясь на то, что МС с ДНК или РНК связывается двумя способами (интеркаляционным и электростатическим), мы полагаем, что непрямолинейная изотерма адсорбции этого лиганда с poly(dA)-poly(dT) также является результатом существования по крайней мере двух способов связывания. Экспериментальные точки, полученные из анализа флуориметрических и абсорбционных данных, при низких заполнениях совпадают друг с другом, а изотерма адсорбции при низких значениях r прямолинейная вплоть до значений  $r \approx 0,15$ . При  $r > 0,15$  на кривой

зависимости  $g/C_f$  от  $g$  образуется излом и, по мере возрастания значений  $g$  на кривой связывания образуется второй прямолинейный участок, как это видно из приведенного рисунка.

Этот факт, как и в случае ДНК или poly(rA)-poly(rU), указывает на существование второго, более слабого способа связывания МС с poly(dA)-poly(dT). Из кривой связывания МС с poly(dA)-poly(dT) определены значения  $K$  и  $n$ , которые обобщены в табл. 1. Для сравнения, в таблице приведены также значения этих параметров, полученных при взаимодействии МС с poly(rA)-poly(rU) и ДНК. Из табличных данных видно, что значения параметров связывания МС с poly(dA)-poly(dT) мало отличаются от таковых, полученных при взаимодействии этого лиганда с poly(rA)-poly(rU), что также указывает на то, что МС с НК связывается как интеркалирующее соединение.

Таким образом, полученные данные указывает на то, что МС с синтетическим полинуклеотидом poly(dA)-poly(dT) связывается двумя способами, один из которых более сильный, интеркаляционного типа, второй, более слабый - электростатического. При этом, этот лиганд не проявляет выраженную специфичность к АТ последовательностям ДНК наподобие желобково связывающихся лигандов - нетропина, Hoechst 33258 и др. Полученные данные показывают, что сильный способ связывания МС с poly(dA)-poly(dT) соответствует полуинтеркаляции, как и в случае взаимодействия этого лиганда с ДНК или poly(rA)-poly(rU). Полученные значения  $K$  и  $n$  также подтверждают эту точку зрения, поскольку находятся в хорошем соответствии с аналогичными величинами, полученными для полуинтеркаляционного способа связывания МС с ДНК или poly(rA)-poly(rU).

Таблица 1

Значения  $K$  и  $n$  при связывании МС с poly(dA)-poly(dT), poly(rA)-poly(rU) и ДНК при ионной силе раствора 20 мМ,  $pH \approx 6.9$ ,  $t = 25$  °С.

Полинуклеотид	Способы связывания			
	Сильный		Слабый	
	$K; 10^5 M^{-1}$	$n$	$K; 10^5 M^{-1}$	$n$
poly(dA)-poly(dT)	$2,5 \pm 0,5$	3÷4	$0,5 \pm 0,05$	$1,5 \div 2$
poly(rA)-poly(rU)	$5,0 \pm 0,5$	3÷4	$1,5 \pm 0,05$	$1,5 \div 2$
ДНК	$6,5 \pm 0,5$	3÷4	$1,5 \pm 0,05$	$1,5 \div 2$

Подтверждением этому предположению может стать также то, что при полуинтеркаляционном способе связывания молекула полинуклеотида не претерпевает существенных структурных изменений, как в случае полной интеркаляции бромистого этидия (БЭ).

Тем не менее, сродство МС к poly(dA)-poly(dT) меньше, чем к poly(rA)-poly(rU) или ДНК. Мы полагаем, что это обусловлено структурными особенностями poly(dA)-poly(dT): в растворе этот полинуклеотид более гидратирован, имеет более жесткую конфигурацию, чем его рибонуклеиновый аналог или ДНК, что и приводит к уменьшению сродства МС к этому полинуклеотиду. Этим, в частности, обусловлена кооперативность связывания классического интеркалятора БЭ с poly(dA)-poly(dT),

поскольку для интеркаляции необходимо, чтобы спираль НК раскручивалась и пары оснований отодвигались на ван-дер-Ваальсовы расстояния. Poly(rA)-poly(rU) же или ДНК не являются столь жесткими полинуклеотидами, поэтому связывание БЭ с ними не кооперативное (Вардеванян и др., 2015). С другой стороны тот факт, что МС, при взаимодействии с ДНК проявляет себя как интеркалирующее, а не желобково связывающее соединение, подтверждается также данными, полученными в (Vardevanyan et al., 2013). На основании вышесказанного мы полагаем, что полуинтеркаляция МС может иметь место как со стороны большого, так и малого желобка (богатого АТ последовательностями) ДНК, что и может быть причиной имитации желобкового связывания этого лиганда с ДНК.

**Исследование комплексов Hoeschst 33258 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) при различных ионных силах раствора.** Специфическое связывание лигандов зачастую может определяться конформационным состоянием НК. В частности, лиганды, специфичные к В-ДНК, могут взаимодействовать и с РНК (А-форма НК), а специфичность некоторых лигандов не ограничивается только сродством к РНК. А-форма НК является более дегидратированной, поэтому водный остов в малом желобке отсутствует. Это приводит к некоторой нестабильности двухцепочечной структуры (дц-) НК в А-форме вследствие усиления отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группами противоположных нитей. Выше было показано, что структурные свойства этих конформаций должны влиять на сродство лигандов к А- или В-формам НК. В случае В-ДНК некоторые лиганды предпочтительнее связываются в малом желобке (нетропсин, DAPI, различные производные Hoeschst), в то время как в случае А-формы (например, дц-РНК) лиганды предпочтительнее связываются в большом желобке (например, аминокликозиды). Однако, до настоящего времени не получены такие соединения, которые проявляют определенную предпочтительность к большой бороздке ДНК, несмотря на то, что этот факт может играть важную и практическую роль для ингибирования связывания некоторых белков, участвующих в экспрессии определенных генов. С этой точки зрения, возникает необходимость сравнительных исследований по взаимодействию лигандов с В- и А-формами дц-НК и выяснение специфичности к определенным последовательностям, а также выяснению их предпочтения к желобкам этих НК.

Исходя из этого, методом УФ-плавления исследовалось взаимодействие АТ специфического желобково связывающегося лиганда Hoeschst 33258 с синтетическими двухцепочечными гомополинуклеотидами poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT), в зависимости от ионной силы раствора. На рис. 12 (а - в) приведены кривые плавления комплексов poly(rA)-poly(rU) с H33258 при ионных силах раствора 0,02; 0,04 и 0,1 М из которых видно, что кривые плавления poly(rA)-poly(rU) и его комплексов с Hoeschst 33258, при любых концентрациях последнего (при значениях концентрационного соотношения  $r = \frac{[\text{лиганд}]}{[\text{НА}]} < 0,067$ , кривые 1 и 2), гладкие, что указывает на переход полинуклеотида и его комплексов с лигандом из двухцепочечного (дц-) в одноцепочечное (оц) состояние. При увеличении концентрации лиганда ( $r > 0,067$ ) кривые перехода становятся не гладкими (рис. 12 (а), кривые 3-5): на этих кривых проявляются низкотемпературный и высокотемпературный участки плавления. Это более отчетливо проявляется на разностных кривых плавления (РКП) (кривые не приводятся). Разностные кривые плавления poly(rA)-poly(rU) и его комплексов с Hoeschst 33258 при  $r < 0,067$  состоят из одного пика, в то время как кривые 3 – 5 состоят из одного, отчетливо проявляющегося пика и из плеча в высокотемпературной области. При этом, эта кривая существенно широкая, что указывает на то, что ширина

интервала плавления poly(rA)-poly(rU) при ионной силе раствора 0,02 М достаточно высокая (~12-14 °С). В результате связывания Н33258 имеет место стабилизации дц-структуры poly(rA)-poly(rU), в результате которого РКП комплексов становятся более гладкими.

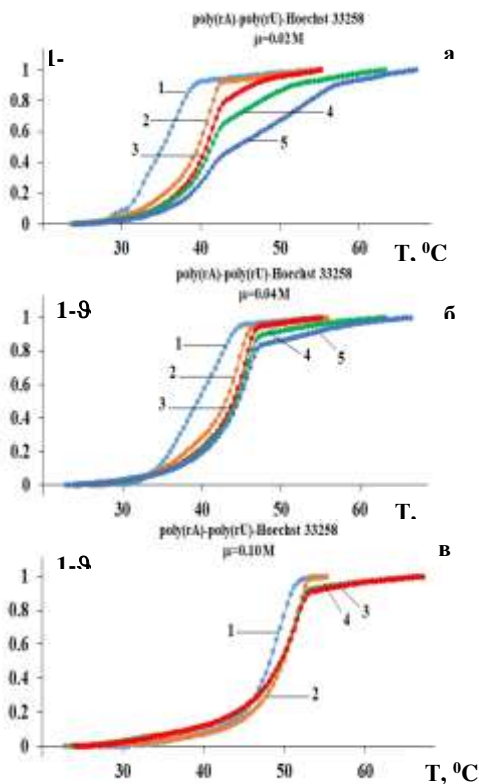


Рис. 12. Кривые плавления poly(rA)-poly(rU) и его комплексов с Н33258 при ионных силах раствора 0,02 (а); 0,04 (б) и 0,1 М (в). Концентрация poly(rA)-poly(rU) составляла  $\sim 6,5 \cdot 10^{-5}$  М/л; концентрационное соотношение Н33258/poly(rA)-poly(rU) изменялось от 0 (кривые 1) до 0,1 (кривые 2-5 на а и б, и 2-4 – на в).

При этом имеет место уменьшение температурного интервала перехода ( $\Delta T$ ) в низкотемпературной области. Уменьшение  $\Delta T$  ранее было обнаружено и при взаимодействии Н33258 с ДНК. Известно, что Н33258 связывается в малом желобке ДНК и проявляет выраженную специфичность к АТ последовательностям, тем самым стабилизируя богатые этими парами участки, вследствие чего  $\Delta T$  уменьшается. Учитывая этот факт мы полагаем, что низкотемпературный участок плавления (интервал  $\sim 30-45$  °С) является результатом локализации Н33258 в большом желобке этого полинуклеотида, который является более предпочтительным для связывания лиганда, чем малый желобок. В противоположность результатам, полученным при ионной силе раствора 0,02 М, интегральные кривые плавления (ИКП) poly(rA)-poly(rU) и его комплексов с Н33258, полученные при ионных силах раствора 0,04 и

0,1 М, гладкие (рис. 1 б и в), а все РКП состоят из одного пика. При этом РКП, соответствующая poly(rA)-poly(rU), опять же значительно широкая при ионной силе 0,04 М и относительно узкая при 0,1 М.

полагаем, что дц-poly(rA)-poly(rU), при относительно низких ионных силах раствора обладает внутримолекулярной структурной неоднородностью, несмотря на то, что является гомополинуклеотидом. Такая внутримолекулярная структурная неоднородность по всей вероятности обусловлена меньшей гидратированностью и нестабильной дц-структурой. На это указывает и тот факт, что, при ионных силах раствора, близких к физиологическим ( $\mu=0,154$  М), структурная стабильность дц-формы poly(rA)-poly(rU) возрастает, вследствие чего РКП сужается и на ней образуется пик, соответствующей более резкому переходу из дц- в оц-состояние. При этом, с увеличением ионной силы раствора стабилизация дц-формы poly(rA)-poly(rU) лигандом (H33258) становится менее выраженной и фактически независимой от концентрации последнего (рис. 12 в).

Аналогичные кривые получены также при плавлении poly(dA)-poly(dT) и его комплексов с H33258 (кривые не приводятся). Полученные кривые при низких концентрациях лиганда двухфазные и фактически этот эффект проявляется независимо от изменения ионной силы раствора, несмотря на то, что при  $\mu=0,1$  М этот эффект менее выражен. Мы полагаем, что указанный эффект обусловлен структурными особенностями poly(dA)-poly(dT). При увеличении  $\gamma$  кривые плавления комплексов становятся гладкими и однофазными. Аналогичным способом получены также РКП комплексов poly(dA)-poly(dT) с H33258. Однако, РКП poly(dA)-poly(dT), в противоположность аналогичной кривой poly(rA)-poly(rU), достаточно узкая, с явно выраженным пиком, что указывает на резкий, фактически скачкообразный переход poly(dA)-poly(dT) из дц- в оц-состояние. РКП комплексов poly(dA)-poly(dT)-H33258 состоят из двух пиков, один из которых образуется в температурной области 55-75 °С, другой – в высокотемпературной ( $T>75$  °С). При соотношениях  $\gamma \geq 0,1$  на РКП проявляется только высокотемпературный пик. Этот эффект проявляется при всех, указанных выше ионных силах раствора. Данные по плавлению комплексов H33258 с poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) указывают на то, что в случае В-формы НК, при низких концентрациях H33258 кривые перехода становятся двухфазными, в то время как с увеличением концентрации лиганда переход становится однофазным. При этом, проявление двухфазного перехода практически не зависит от ионной силы раствора. В случае poly(rA)-poly(rU) проявляется квазидвухфазный переход при ионных силах раствора ( $\mu \leq 0,02$  М), а при увеличении ионной силы ( $\mu > 0,02$  М) переход становится однофазным. Отметим также, что квазидвухфазное плавление в случае комплексов H33258 с poly(rA)-poly(rU) наблюдается при относительно больших концентрациях лиганда ( $\gamma \geq 1/15$ ).

Двухфазное плавление комплексов H33258 с poly(dA)-poly(dT) обусловлено двумя переходами: из трехцепочечного в двухцепочечное, в области  $T \approx 55-75$  °С и из двухцепочечного в одноцепочечное – при  $T > 75$  °С. Обычно двухфазный переход наблюдается, когда УФ поглощение триплексной ДНК представляется в виде функции от температуры (Агуа, 2011). По всей вероятности, такой же переход имеет место при плавлении комплексов H33258 с poly(rA)-poly(rU) при ионной силе раствора 0,02. Этот факт подтверждается однофазными кривыми плавления комплексов H33258 с poly(rA)-poly(rU) при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М, которые указывают на то, что в этих условиях термодинамически выгодным является дц-структура в комплексе с H33258, поскольку при  $\mu=0,02$  М не исключается, что



нестабильная дц-структура poly(rA)-poly(rU) частично может переходить в трехцепочечное состояние в комплексе с H33258.

**Термодинамический анализ взаимодействия Hoeschst 33258 с poly(rA)-poly(rU) при различных ионных силах раствора.** Термодинамический анализ взаимодействия Hoeschst 33258 с poly(rA)-poly(rU) осуществлялся при различных ионных силах раствора на основании абсорбционных и флуоресцентных измерений при температурах 293; 303 и 313 К. На основании спектроскопических данных построены изотермы адсорбции и определены значения  $K$  и  $n$ , а также  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta G$  (табл. 2 и 3), при ионных силах раствора 0,02 и 0,04 М.

Таблица 2. а

Термодинамические параметры связывания Hoeschst 33258 с ДНК и poly(rA)-poly(rU) при ионной силе раствора  $\mu=0.02$  М

Т, К	$K \cdot 10^{-8}, M^{-1}$	$-\Delta G,$ ккал/моль	$\Delta H,$ ккал/моль	$\Delta S,$ кал/(моль·К)	$n$
ДНК					
293	0,80±0,05	10,70±1.5	5,0±1.5	53,5±0.5	6,0±0.5
303	1,05±0,05	11,21±1.5			6,0±0.5
313	1,50±0,05	11,80±1.5			5,5±0.5
poly(rA)-poly(rU)					
293	0,005±0,05	7,7±1.5	2,2±1,5	33,5±1.0	2,0±0,5
303	0,005±0,05	7,95±1.5			2,0±0,5
313	0,006±0,05	8,32±1.5			2,0±0,5

Таблица 2. б

Термодинамические параметры связывания Hoeschst 33258 с ДНК и poly(rA)-poly(rU) при ионной силе раствора  $\mu=0.04$  М

Т, К	$K \cdot 10^{-8}, M^{-1}$	$-\Delta G,$ ккал/моль	$\Delta H,$ ккал/моль	$\Delta S,$ кал/(моль·К)	$n$
ДНК					
293	0,65±0,05	10,54±1.5	5,2±1.5	54,0±0.5	5,5±0.5
303	0,85±0,05	11,13±1.5			5,5±0.5
313	1,20±0,05	11,65±1.5			5,0±0.5
poly(rA)-poly(rU)					
293	0,05±0,05	9,04±1.5	6,5±1,5	53,0±1.0	3,0±0,5
303	0,07±0,05	9,55±1.5			2,5±0,5
313	0,10±0,05	10,09±1.5			2,5±0,5

В таблицах для сравнения приведены аналогичные значения термодинамических параметров взаимодействия Hoechst 33258 с ДНК. Как видно из представленных таблиц, константа связывания Hoechst 33258 с ДНК больше, чем с poly(rA)-poly(rU). При этом, при увеличении ионной силы раствора от 0.02 до 0.1 М, величина К претерпевает небольшое изменение при связывании этого лиганда с ДНК, в то время как в случае poly(rA)-poly(rU) имеет место значительное возрастание этого параметра с увеличением ионной силы.

Это обусловлено тем, что poly(rA)-poly(rU) при ионной силе раствора 0.02 М находясь в нестабильной дц-форме, практически денатурирована при температурах  $T < 293$  К. При более высоких ионных силах, когда дц-структура poly(rA)-poly(rU) переходит в стабильное состояние, значения К возрастают (при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М получаются близкие значения для К и n). Однако, по мере увеличения температуры наблюдается небольшое возрастание К, что приводит к положительному изменению энтальпии, как и в случае ДНК. Тем не менее, при взаимодействии Н33258 с дц-poly(rA)-poly(rU) (при ионных силах 0.04 и 0.1 М) величина К примерно на порядок меньше, чем с ДНК, что может быть обусловлено несколькими причинами: А-формой НК, вследствие чего геометрическое соответствие между молекулой лиганда и НК уменьшено из-за более глубокого и узкого желобка, или отсутствием GC пар, или обоими одновременно. Из табличных данных видно также, что в случае ДНК значения  $\Delta H$ , по мере увеличения ионной силы раствора претерпевают меньшее изменение, чем в случае poly(rA)-poly(rU). Еще большее изменение претерпевает энтропия комплексообразования Н33258 с дц-poly(rA)-poly(rU). В случае же ДНК изменение энтропии возрастает на 2-3 кал/(моль К), при увеличении ионной силы. Изменение же свободной энергии больше при комплексообразовании Н33258 с ДНК, чем с poly(rA)-poly(rU), что указывает на предпочтительность связывания этого лиганда с В-ДНК.

Следует отметить, что по мере роста ионной силы раствора, связывание Н33258 с poly(rA)-poly(rU) становится все более и более выгодным энтальпийно, по сравнению с ДНК, при этом при связывании лигандов с ДНК энтропийные потери растут. Возможным механизмом является повышение гибкости за счет экранирования электростатического отталкивания, что, в свою очередь приводит к усилению геометрического соответствия между лигандом и центром связывания.

Таким образом, полученные данные показывают, что лиганд Н33258, специфичный к В-форме ДНК, может также связываться с дц-полинуклеотидами, находящимися в А-форме. При этом, как и в случае ДНК, так и в случае poly(rA)-poly(rU), взаимодействие происходит по энтальпийно-энтропийному компенсационному механизму, при котором изменение энтальпии положительное. Этот факт указывает на то, что одним из факторов специфичности Н33258 к дц-НК является геометрическое соответствие между молекулой лиганда и малым желобком нуклеиновой кислоты, которое меняется как в зависимости от температуры, так и от ионной силы раствора. Полученные экспериментальные данные также указывают на то, что Н33258 взаимодействует и с полинуклеотидами, состоящими только из АТ(АУ) пар, несмотря на то, что более предпочтительным для этого лиганда являются последовательности НК, состоящие из центральных (АТ)<sub>n</sub> (n=4-6) пар, которые с обоих концов граничат GC парами. При этом, при взаимодействии Н33258 с ДНК главными являются АТ-специфичное связывание в малом желобке, и интеркаляция в GC-богатые участки, в то время как при связывании с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU), при определенных концентрациях этот лиганд вызывает структурный

переход полинуклеотидов из двухцепочечного в трехцепочечное состояние. Этот эффект более выражен при В-форме НК, поскольку проявляется независимо от ионной силы раствора, в то время как в случае А-формы этот эффект проявляется при низких ионных силах раствора, при относительной нестабильности дц-структуры. С увеличением ионной силы раствора дц-структура А-формы НК стабилизируется и дуплекс-триплекс переход прекращается. То же самое имеет место при увеличении концентрации Н33258. На основании этого мы полагаем, что особенности взаимодействие Н33258 с НК зависят от конформационного состояния последней, особенно от структурных особенностей желобков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование кинетики взаимодействия малых молекул с нуклеиновыми кислотами (НК). При этом, связывание лиганда с НК описывается в рамках теории случайных процессов и показано, что вероятностное описание взаимодействия лиганда с НК позволяет не только описать кинетику изменения числа связанных с НК малых молекул при произвольном заполнении, но и вычислить стационарные значения числа связанных с НК лигандов и его дисперсию. Показано, что скорость заполнения подложки ДНК-дуплексами увеличивается с ростом, как константы равновесия реакции образования ДНК-дуплексов, так и концентрации мишеней ДНК в растворе, поскольку кинетика интеркаляции лигандов в ДНК-дуплексы существенным образом зависит от соотношения констант скорости диссоциации ДНК-дуплекса и скорости диссоциации комплекса лиганда с ДНК-дуплексом. Также показано, что совместный анализ изотермы адсорбции и кинетики связывания лигандов с НК позволяет определить константы скоростей образования и распада комплекса лиганда с НК. Вышеприведенное относится к дц-ДНК или дц-РНК, в качестве модели которой был выбран poly(rA)-poly(rU), который в интервале изменения ионной силы раствора  $0.02 \leq \mu \leq 0.1$  М и в присутствии одновалентных катионов, например  $\text{Na}^+$ , находится только в двухцепочечном (дц-) состоянии.

Показано, что poly(rA)-poly(rU), как и дц-РНК, имеет относительно нестабильную структуру при низких ионных силах раствора ( $\mu < 0,04$  М), которая стабилизируется при увеличении ионной силы раствора. В частности, показано, что при концентрации одновалентного катиона  $\text{Na}^+$  - 0,02 М, poly(rA)-poly(rU) имеет метастабильную дц-структуру, которая переходит в более стабильное дц-состояние с увеличением концентрации катионов (Vardevanyan P.O. et al, 2019). При этом, в условиях относительно низких ионных сил раствора ( $\mu \leq 0,1$ М) poly(rA)-poly(rU) не переходит в трехцепочечное состояние, особенно в присутствии только одновалентных катионов или некоторых интеркаляторов. Одним из важных результатов, полученных в данном исследовании является то, что в дц- состоянии этот полинуклеотид может с высоким сродством взаимодействовать с дц-ДНК специфическими лигандами, что указывает на то, что дц-структура НК является основной мишенью для большинства лигандов. Полученные данные также указывают на то, что исследованные в работе лиганды с дц-РНК (poly(rA)-poly(rU)) связываются со всеми свойственными им способами.

В частности, классический интеркалятор и мультимодальный лиганд БЭ с различными формами дц-НК связывается одними и теми же механизмами, а именно, интеркаляционным, полунтеркаляционным, электростатическими. Примечательно однако, что этот лиганд проявляет предпочтительность к А-форме НК, по сравнению

с В-формой. На основании полученных данных было выявлено, что стабилизирующее влияние БЭ на дц-структуру НК меняется в следующем порядке: дц-ДНК < дц-poly(dA)-poly(dT) < дц-poly(rA)-poly(rU).

В работе был предложен также новый метод анализа изобестической точки (ИТ), которая образуется на спектрах поглощения различных соединений при химических превращениях или при взаимодействии с другими молекулами. Так, в случае некоторых интеркаляторов, таких, как БЭ, профлаavin, актиномицин Д и др., в спектрах поглощения образуется ИТ, которая ранее считалась критерием интеркаляционного способа связывания этих лигандов с дц-ДНК. Предложенный способ анализа ИТ из спектров поглощения исключает субъективные ошибки, что, в конечном итоге, дает возможность с большей точностью определить состояние, когда все молекулы лиганда полностью связаны с нуклеиновой кислотой.

Проведены также исследования по взаимодействию другого интеркалятора, метиленового синего (МС) с poly(dA)-poly(dT), а также с poly(dA)-poly(dT). Эти исследования выявили, что при полуинтеркаляционном способе связывания МС, структура указанных полинуклеотидов не претерпевает существенных изменений, как в случае полной интеркаляции БЭ, несмотря на то, что сродство МС к poly(dA)-poly(dT) (жесткая В-форма НК) меньше, чем к более гибкой poly(rA)-poly(rU) (А-форма) или ДНК (более гибкая В-форма). При этом, на основании полученных данных можно полагать, что полуинтеркаляция МС может иметь место как со стороны большого, так и малого желобка (богатого АТ последовательностями) ДНК, что может быть причиной кажущегося желобкового связывания этого лиганда с НК. Обнаружено также, что МС связывается с метастабильной дц-структурой poly(rA)-poly(rU) по механизму как полуинтеркаляции, так и полной интеркаляции, в то время как сродство этого лиганда к стабильной дц-структуре poly(rA)-poly(rU) и ДНК уменьшается при относительно больших ионных силах. Это обусловлено тем, что структура НК переходит в более упакованное состояние и становится недоступной для интеркаляции тизинового красителя МС.

Исследовано также взаимодействие желобкового лиганда H33258 с poly(rA)-poly(rU), а также с poly(dA)-poly(dT) и ДНК. При взаимодействии с ДНК, H33258 связывается в ее малом желобке, с ярко выраженной АТ-специфичностью и интеркаляцией с GC-богатыми участками. При связывании же с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU), при определенных концентрациях этот лиганд вызывает дуплекс-триплексный структурный переход.

Этот эффект H33258 на структуру указанных полинуклеотидов более выражен в случае В-формы НК и не зависит от ионной силы раствора, а в случае А-формы этот эффект проявляется при низких ионных силах раствора, при относительной нестабильности дц-структуры. С увеличением ионной силы раствора дц-структура А-формы НК стабилизируется и дуплекс-триплексный переход прекращается.

Проведенный полный термодинамический анализ же комплексообразования желобковых лигандов нетропсина и Hoechst с двухпочечной РНК выявляет, что, оба лиганда связываются с АТ (АУ) парами практически одинаковым механизмом, однако в случае нетропсина это взаимодействие сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время как в случае Hoechst – положительным, при этом, вклад энтропийного фактора в образовании комплексов более выражен в случае Hoechst, что, по всей вероятности, имеет компенсирующее значение для стабилизации комплексов.

## ВЫВОДЫ

1. Связывание лиганда с нуклеиновыми кислотами (НК), описываемое в рамках теории случайных процессов позволяет не только изучать кинетику изменения числа связанных с НК лигандов при произвольном заполнении, но и вычислить стационарные значения числа адсорбированных на НК лигандов и его дисперсию. В то же время, совместный анализ изотермы адсорбции и кинетики связывания лигандов с НК позволяет определить константы скоростей образования и распада комплекса лиганда с НК.
2. Получена система дифференциальных уравнений, описывающая согласованное изменение числа ДНК-дуплексов на подложке и изменение числа лигандов, интеркалированных в ДНК-дуплексы показывает, что скорость заполнения подложки ДНК-дуплексами увеличивается с ростом, как константы равновесия реакции образования ДНК-дуплексов, так и концентрации мишеней ДНК в растворе, поскольку кинетика интеркаляции лигандов в ДНК-дуплексы существенным образом зависит от соотношения констант скорости диссоциации ДНК-дуплекса и скорости диссоциации комплекса лиганда с ДНК-дуплексом.
3. Poly(rA)-poly(rU), в интервале изменения ионной силы раствора  $0.02 \leq \mu \leq 0.1$  М и в присутствии одновалентных катионов  $\text{Na}^+$  при комнатных температурах находится только в двухцепочечном (дц-) состоянии и стабилизируется при увеличении ионной силы раствора, поскольку из метастабильной формы переходит в более стабильное дц-состояние.
4. При относительно низких ионных силах раствора ( $\mu \leq 0,1$  М) poly(rA)-poly(rU), не переходит в трехцепочечное состояние в присутствии только одновалентных катионов или некоторых интеркаляторов, несмотря на то, что большинство интеркалирующих лигандов могут инициировать такой переход. В дц- состоянии этот полинуклеотид может с высоким средством связываться со специфическими к дц-ДНК лигандами, а указанные лиганды - проявить присущие им способы связывания.
5. Классический интеркалятор и мультимодальный лиганд БЭ связывается одними и теми же механизмами с различными формами дц-НК, при этом проявляя предпочтение к А-форме НК, по сравнению с В-формой. В результате этого, стабилизирующее влияние БЭ на дц-структуру НК меняется в следующем порядке: дц-ДНК < дц-poly(dA)-poly(dT) < дц-poly(rA)-poly(rU). Эта особенность БЭ указывает на то, что механизмы связывания БЭ фактически не зависят от ионной силы раствора, от формы нуклеиновой кислоты и от нуклеотидного содержания последней.
6. При полуинтеркаляционном способе связывания МС, структура полинуклеотида не претерпевает существенных изменений, как в случае полной интеркаляции БЭ, несмотря на то, что средство МС к poly(dA)-

poly(dT) меньше, чем к более гибкой А- форме (РНК). Полуинтеркаляция МС может иметь место как со стороны большого, так и малого желобка ДНК, что может быть причиной кажущегося желобкового связывания этого лиганда с НК.

7. С метастабильной дц-структурой poly(rA)-poly(rU) МС связывается по механизму как полуинтеркаляции, так и полной интеркаляции, в то время как сродство этого лиганда к стабильной дц-структуре poly(rA)-poly(rU) и ДНК уменьшается при относительно больших ионных силах, поскольку структура НК переходит в более плотноупакованное состояние и становится недоступной для интеркаляции тизинового красителя МС.
8. При взаимодействии с ДНК, Н33258 связывается в ее малом желобке, с ярко выраженной АТ-специфичностью и интеркаляцией с GC-богатыми участками. При связывании с poly(dA)-poly(dT) и poly(rA)-poly(rU), при определенных концентрациях этот лиганд вызывает дуплекс-триплексный структурный переход, который более выражен в случае В-формы НК и не зависит от ионной силы раствора. В случае же А-формы этот эффект проявляется при низких ионных силах раствора, при относительной нестабильности дц-структуры. С увеличением ионной силы раствора дц-структура А-формы НК стабилизируется и дуплекс-триплексный переход прекращается.
9. Полный термодинамический анализ комплексообразования нетропсина и Н33258 с двухцепочечной РНК показывает, что, несмотря на то, что оба лиганда предпочтительнее связываются с АТ (АУ) парами практически одинаковым механизмом, в случае нетропсина это взаимодействие сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время как в случае Н33258 – положительным. При этом, вклад энтропийного фактора в образовании комплексов более выражен в случае Н33258, что, по всей вероятности, имеет компенсирующее значение для стабилизации комплексов.
10. Экспериментальные данные указывают на то, что РНК в равной мере, как и ДНК, может взаимодействовать с многочисленными лигандами, специфичными к ДНК. Более того, в некоторых случаях РНК может служить более предпочтительной мишенью для различных лигандов, в том числе, лекарственных препаратов, что открывает новые возможности для модуляции клеточных процессов с помощью различных биологически активных соединений.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетыан А.Т. Связывание бромистого этидия с одноцепочечной ДНК, Биофизика, 2003, т.48, N4, с.644-647.**
2. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Markaryan A.Sh., Kazaryan R.S., Babayan Yu.S., Disperse of bound ligands method in study of adsorption isotherm. Proceedings of 13<sup>th</sup> Conversation on Biomolecule Structure and Dynamics, 2003, Albany, J. Biomol.Struct.Dyn., v.20, N6, p.857.
3. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetyan A.T., Complex-Formation of Ethidium Bromide with Poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)], J. of Biomol. Struct. & Dynam., 2005, v. 22, N 4, pp. 465-470.**
4. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Boyajyan Z.R., Karapetyan A.T., Comparative study of interaction of DNA with EtBr and Hoechst 33258, International Alumni seminar on "Biotechnology and health", Yerevan, October 18-21, 2005, P.74-81.
5. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Karapetian R.A., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A. Different modes of Hoechst 33258 binding with different GC-content DNAs, Proceedings of 16<sup>th</sup> Conversation on Biomolecule Structure and Dynamics, Albany, 2009, June 16-20, J. Biomol.Struct.Dyn., v.26, N6, p.878.
6. Arakelyan V.B., Hovhannisyanyan G.G., Navoyan Z.E., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. // The kinetics of cooperative binding of ligands with DNA. International Conference "Current Problems of Chemical Physics" dedicated to the 50<sup>th</sup> anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA. 9-12 Oct., 2012, Yerevan, Book of Abstracts, p. 30-32.
7. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Hambardzumyan L.A., Minasyants M.V. Comparative analysis of complex-formation of ethidium bromide, methylene blue and Hoechst 33258 with DNA. International Conference "Physical Concepts of Nucleic Acid Structure and Behavior", Yerevan, Armenia, May 27-29, 2013, p. 39-40.
8. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Minasyants M.V., Karapetian A.T. Spectroscopic investigation of methylene blue binding to DNA. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, v.31, N S1, 1-139, Supplement, Book of Abstracts. Albany, 2013: The 18th Conversation 2013, p. 59.
9. **Arakelyan V.B., Vardevanyan P.O., Navoyan Z.E., Parsadanyan M.A., Hovhannesyanyan G.G., Karapetian A.T. Kinetics of adsorption of extended ligands on DNA at small fillings. J. of Biomol. Struct. & Dynam., 2014, v.32, N2, p. 330-333.**

10. **Vardevanyan P.H., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V. Ethidium bromide with Poly(G), *Biophys. Rev. and Lett.*, 2014, v.9, N3, p.239-247.**
11. **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*, 2014, т.81, N6, p. 970-973.**
12. Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. The binding mechanisms of methylene blue with DNA. *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, Book of Abstracts, Albany 2015, The 19th Convers., v. 33, sup. 1, p. 95-96.
13. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V. Spectral characteristics of DNA-EtBr and DNA-MB complexes. *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, Book of Abstracts, Albany 2015, The 19th Convers., v. 33, sup. 1, p. 95.
14. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Саакян В.Г. Исследования совместного связывания акридинового оранжевого и бромистого этидия с ДНК. Доклады НАН РА, 2017, т.117, N1, с. 74-81.
15. **Вардеванян П.О., Парсаданян М.А., Антонян А.П., Акопян С.Н. Анализ термодинамических параметров связывания бромистого этидия и митоксантрона с ДНК по изотермам адсорбции, *Журнал физической химии*, 2017, т.91, N6, с.1143-1145.**
16. Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Sahakyan V.G., Vardevanyan P.O. Melting parameters of DNA complexes with several intercalators. *Proc. of The YSU, Chem and Biol.*, 2017, v. 51, N1, p. 27-30.
17. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Sahakyan V.G. Peculiarities of interaction of synthetic polyribonucleotide poly(rA)-poly(rU) with some intercalators. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2017, p.3607-3613.**
18. **Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Vardevanyan P.O., Sngryan H.E. Interaction of methylene blue with synthetic polynucleotide poly(dA)-poly(dT), *Biophys. Rev. and Lett.*, 2017, v.13, N1, p.29-36.**
19. **Вардеванян П.О., Парсаданян М.А., Антонян А.П., Саакян В.Г. Спектроскопическое исследование связывания нетропсина и Hoechst 33258 с нуклеиновыми кислотами. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2018, т. 85, N2, с. 325-330.**
20. Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Torosyan M.A., Karapetyan A.T. Hoechst 33258 compound interaction with different GC-content DNA, *Proceedings of the YSU*, 2019, v.53, N2, p.107-112.
21. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Sahakyan V.G. Comparative study of binding of some intercalating compounds with DNA. *J. of Biomol. Struct. and Dyn.*, Albany 2019: 20<sup>th</sup> Conversations – Abstracts, 11-15 June, 2019, v.37, N S1, p. 77.



22. Arakelyan V.B., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Effect of concentration of ligands on DNA-biosensor average output signal and dispersion. *J. of Biomol. Struct. and Dyn.*, Albany 2019: 20<sup>th</sup> Conversations – Abstracts, 11-15 June, 2019, v.37, N S1, p.79.
23. Аракелян В.Б., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Вардеванян П.О. Влияние адсорбции лигандов на статистические характеристики выходного сигнала ДНК-биосенсора. VI Съезд биофизиков России, 16-21 сентября, 2019, Сочи, Россия, Сборник научных трудов, т. 1, с.107.
24. Вардеванян П.О., Парсаданян М.А., Антонян А.П., Шагинян М.А. Изучение комплексов ДНК с лигандами различной природы. VI Съезд биофизиков России, 16-21 сентября, 2019, Сочи, Россия, Сборник научных трудов, т. 1, с.132-133.
25. Parsadanyan M.A. Comparative study of ethidium bromide interaction with synthetic polynucleotides ds-poly(rA)-poly(rU) and ds-poly(dA)-poly(dT), *Proceedings of the YSU*, 2019, v.53, N3, p.175-179.
26. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A. Study of the influence of the ionic strength on complex-formation of ethidium bromide with poly(rA)-poly(rU). *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2019, v. 37, N5, p. 2493-2498.**
27. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А. Термодинамика взаимодействия полинуклеотида poly(rA)-poly (rU) с лигандами-интеркаляторами, *Известия НАН Армении, серия Физика*, 2020, т.55, N1, с.126-135.
28. Parsadanyan M.A. Study of binding peculiarities of ethidium bromide and methylene blue with double-stranded RNA, *Proceedings of the YSU*, 2020, v.54, N1, p.38-45.
29. Аракелян В.Б., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Вардеванян П.О. Изменение выходного сигнала ДНК-биосенсора, индуцированного адсорбцией лигандов на дуплексы ДНК в флуктуирующей среде, *Биофизика*, 2020, т.65, N4, с.670-675.
30. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A. Thermodynamic analysis of Hoechst 33258 interaction with poly(rA)-poly(rU), *Biolog. j. of Armenia*, 2020, 1-2, 72, p.17-23.
31. **Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Karapetyan A.T. Spectroscopic study of interaction of various GC-content DNA with Hoechst 33258 depending on Na<sup>+</sup> concentration. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2020, p.1519-1523.**
32. Arakelyan V.B., Mamasakhlishov A.Y., Kazaryan E.M., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Hybridization kinetics of DNA fragments in the presence of ligands intercalating into DNA-duplexes. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2020, p. 1907-1911.

33. Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Antonyan A.P. Study of methylene blue interaction with synthetic polynucleotide poly(rA)-poly(rU). Proc. of The YSU, Chem. and Biol., 2020, v.54, N2, p.112-117.
34. Vardevanyan P., Parsadanyan M., Antonyan A., Shahinyan M. Interaction of Double Stranded Nucleic Acids with Different Ligands, V International Conference of Biotechnology and Health, Book of abstracts, Yerevan, Armenia, 29-31 October, 2020, p.134-135.
35. Parsadanyan M., Antonyan A., Shahinyan M., Vardevanyan P. Thermodynamic Analysis of Hoechst 33258 Interaction with Poly(rA)-Poly(rU), V International Conference of Biotechnology and Health, Book of abstracts, Yerevan, Armenia, 29-31 October, 2020, p.108-109.
- 36. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Shahinyan M.A. Study of complexes of Hoechst 33258 with poly(rA)-poly(rU) depending on various ionic strengths in the water-saline solution, J. of Biomol. Struct. & Dyn., 2020, 10.1080/07391102.2020.1823883.**
37. Parsadanyan M.A. Duplex-triplex transition in complexes of nuclear acids with Hoechst 33258, Proceedings of the YSU, 2021, v.55,N1, p.39-45.

## ՓԱՐՄԱԴԱՆՅԱՆ ՄԱՐԻՆԵ ԱՇՈՏԻ

ՏԱՐԱԲՆՈՒՅԹ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ POLY(rA)-POLY(rU)  
ՄԻՆԹԵՏԻԿ ՊՈԼԻԼՈՒԿԼԵՆՏԻԴ -Ի ՀԵՏ

### ԱՄՓՈՓՈԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. Կինետիկ մոդել, կենսասենսորներ, կենսաչիփեր, էթիդիումի բրոմիդ, դասական ինտերկալյատոր, երկշղթա ՌՆԹ, poly(rA)-poly(rU), մեթիլենային կապույտ, կիսաինտերկալյացիա, Hoechst 33258, ակոսային կապում:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է նուկլեինաթթուների (ՆԹ) հետ լիզանդների կապման կինետիկան պատահական պրոցեսների տեսության հիման վրա: ՆԹ-ի հետ լիզանդի կապման հավանականության ուսումնասիրությունը թույլ է տալիս ոչ միայն նկարագրելու ՆԹ-ի հետ լիզանդի կապված մոլեկուլների թվի փոփոխության կինետիկան՝ կամայական հագեցումների դեպքում, այլև որոշելու լիզանդի կապված մոլեկուլների ստացիոնար արժեքը և դրա դիսպերսիան: ՆԹ-ի հետ լիզանդի կապման կինետիկայի և կապման կորերի համատեղ վերլուծությունը նաև թույլ է տալիս որոշել ՆԹ-ի հետ լիզանդի համալիրների առաջացման և քանդման արագությունների հաստատունների արժեքները:

Հետազոտվել է նաև ներդիրի վրա ԴՆԹ-ի միաշղթա հատվածների հիբրիդացման կինետիկան, երբ ներդիրի շրջակայքում առկա են լիզանդի մոլեկուլներ, որոնք կարող են ինտերկալացվել (ներդրվել) ԴՆԹ-ի երկշղթա տեղամասեր: Ստացված է դիֆերենցիալ հավասարումների համակարգ, որը նկարագրում է ներդիրի վրա ԴՆԹ-ի երկշղթա մոլեկուլների և դրանցում ինտերկալացված լիզանդների թվի փոփոխությունները: Ուսումնասիրվել է կենսասենսորների հետ լիզանդների կապման կինետիկան դիֆերենցիալ հավասարումների միջոցով և ցույց է տրվել, որ ֆլուկտուացվող միջավայրի (արտաքին աղմուկ) ազդեցության ներքո տեղի է ունենում լուծույթում լիզանդի քանակի ֆլուկտուացիա, իսկ մուլտիպլիկատիվ աղմուկի դեպքում տեղի է ունենում կենսասենսորի (կենսաչիփի) էլքային ազդանշանի նվազում, որն ունի շեմային արժեք:

Ուսումնասիրվել է իոնական ուժի ազդեցությունը երկշղթա ՌՆԹ-ի մոդել հանդիսացող poly(rA)-poly(rU)-ի կառուցվածքի և էԲ-ի հետ դրա փոխազդեցության վրա: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ միավալենտ կատիոնների դեպքում, լուծույթի 0,02; 0,04 և 0,1 մոլ իոնական ուժերում poly(rA)-poly(rU)-ն գտնվում է երկշղթա վիճակում, ընդ որում, 0,02 մոլ իոնական ուժի պայմաններում այն ունի մետակայուն, իսկ ավելի մեծ իոնական ուժերում՝ կայուն երկշղթա կառուցվածք: Ցույց է տրված, որ poly(rA)-poly(rU)-ի հետ ևս էԲ-ն կապվում է իրեն բնորոշ եղանակներով, մասնավորապես, ինչպես

ինտերկալյացիոն, այնպես էլ կիսահինտերկալյացիոն և էլեկտրաստատիկ: Նաև ցույց է տրվել, որ ԷԲ-ն ՆԹ-ի A- և B-ձևերի նկատմամբ տարբեր խնամակցություն է դրսևորում, որը փոփոխվում է հետևյալ շարքում՝  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU}) > \text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT}) > \text{ԴՆԹ}$ : Բացահայտվել է նաև, որ 0.02→0.04 միջակայքում լուծույթի իոնական ուժի մեծացման դեպքում տեղի է ունենում այդ պոլիմուկլեոտիդի հետ ԷԲ-ի կապման հաստատունի՝ K-ի արժեքի աճ, ինչպես նաև կապման մեկ տեղին համապատասխանող նուկլեոտիդների թվի՝ n-ի նվազում, մինչդեռ իոնական ուժի հետագա մեծացման դեպքում տեղի է ունենում K-ի նվազում, n-ի աճ:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU})$ -ի հետ ԷԲ-ի և ՄԿ-ի միացումն ավելի նախընտրելի է լուծույթի 0,04 մոլ իոնական ուժում, որի պայմաններում այդ պոլիմուկլեոտիդն ունի այնպիսի կառուցվածք, որը հասանելի է ԷԲ-ի ինտերկալյացիայի և ՄԿ-ի կիսահինտերկալյացիայի համար: Նաև ցույց է տրվել, որ լուծույթի իոնական ուժի մեծացման դեպքում ԷԲ-ի փոխազդեցության թերմոդինամիկ պարամետրերի՝  $\Delta H$ -ի և  $\Delta S$ -ի արժեքներն աճում են, մինչդեռ ՄԿ-ի դեպքում այդ պարամետրերն աճում են 0.02→0.04 միջակայքում, այնուհետև նվազում են:

Ուսումնասիրվել է նաև  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU})$  և  $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$  հոմոպոլիմուկլեոտիդների հետ ակոսային կապվող միացություն H33258-ի փոխազդեցությունը  $\mu=0,02; 0,04$  և  $0,1$  մոլ իոնական ուժերում և ցույց է տրվել, որ այդ ՆԹ-ի հետ նշված լիզանդի համալիրների հալման կորերը տարբեր վարք են դրսևորում՝ լուծույթի իոնական ուժից և լիզանդ/ՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունից կախված: Մասնավորապես, 0,02 մոլ իոնական ուժում  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU})\text{-H33258}$  համալիրների հալման կորերը ձեռք են բերում երկաստիճան տեսք լիզանդի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում, մինչդեռ  $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$ -ի հետ այդ լիզանդների համալիրների հալման կորերը երկաստիճան են H33258-ի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում, որոնք դառնում են հարթ՝ ավելի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում: Այդ երևույթը  $\text{poly}(\text{dA})\text{-poly}(\text{dT})$ -ի դեպքում դրսևորվում է իոնական ուժից անկախ, մինչդեռ  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU})$ -ի դեպքում երկաստիճան հալման կոր ստացվել է միայն 0,02 մոլ իոնական ուժում: Ցույց է տրվել, որ դա պայմանավորված է պոլիմուկլեոտիդների՝ H33258-ով հրահրված եռաշղթա կառուցվածքի առաջացմամբ և եռաշղթա-երկշղթա-միաշղթա կառուցվածքային փոխարկումով: Իրականացվել են նաև  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU})$ -ի հետ H33258 և նետրոպսին (ակոսային կապվող լիզանդ) միացությունների փոխազդեցության թերմոդինամիկ հետազոտություններ, որոնք ցույց են տվել, որ Hoechst 33258-ի կապման դեպքում տեղի է ունենում էնթալպիայի դրական փոփոխություն, նետրոպսինի դեպքում՝ բացասական: Ընդ որում,  $\text{poly}(\text{rA})\text{-poly}(\text{rU})$ -ի հետ H33258-ի համալիրների առաջացման գործընթացում էնթոպիական գործոնի ներդրումն ավելի մեծ է, քան նետրոպսինի դեպքում:

INTERACTION OF DIFFERENT LIGANDS WITH SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDE  
POLY(rA)-POLY(rU)

SUMMARY

Keywords: Kinetic model, biosensors, biochips, ethidium bromide, classical intercalator, double-stranded RNA, poly(rA)-poly(rU), methylene blue, semi-intercalation, Hoechst 33258, groove binding.

In the presented work the binding kinetics of ligands with nucleic acids (NA) has been studied on the basis of the theory of random processes. The binding relative study of ligand with NA permits not only describing kinetics of the number of ligand bound molecules to NA at random saturations, but also determining stationary value of ligand bound molecules and dispersion of this value. Joint analysis of ligand binding kinetics to NA and binding curves also allows to determine the values of constants of association and dissociation rates of ligand complexes with NA.

Hybridization kinetics of DNA single-stranded regions on underlayer was also examined, when in the vicinity of the underlayer there are ligand molecules that are able to intercalate (insert) into DNA double-stranded regions. System of the differential equations was obtained, which describes changes of number of DNA double-stranded molecules and ligands, intercalated into them. Binding kinetics of ligands to biosensors through differential equations was studied and it was shown that ligand amount fluctuation occurs under the effect of fluctuating medium (external noise), but for multiplicative noise the output signal decreasing of biosensor (biochip) takes place, which has a threshold value.

The effect of ionic strength on the structure of double-stranded RNA model poly(rA)-poly(rU) and on its interaction with EtBr has been investigated. The obtained data show that in the case of single-valence cations and the solution ionic strength 0.02, 0.04 and 0.1 mol, poly(rA)-poly(rU) is in double-stranded state, though, in the conditions of the ionic strength 0.02 mol it has meta-stable structure and in higher ionic strengths – stable double-stranded structure. It was shown that EtBr binds to poly(rA)-poly(rU) by characteristic modes, particularly both intercalation and semi-intercalation as well as electrostatic ones. EtBr was also shown to perform various affinity to A- and B-forms of NA, which changes in the following range – poly(rA)-poly(rU) > poly(dA)-poly(dT) > DNA. It was also revealed that in the interval of the ionic strength of the solution 0.02 → 0.04 along with the ionic strength increasing, the enhancement of EtBr binding constant K to this polynucleotide occurs, as well as the value of n, corresponding to number of nucleotides per binding site decreases. At the same time along with further enhancement of the ionic strength K decreases, n – increases.

The studies have shown that the binding of EtBr and MB to poly(rA)-poly(rU) is more preferable at the ionic strength of the solution 0.04 mol, when this polynucleotide has a structure, available for EtBr intercalation and MB semi-intercalation. It was also revealed that with the increasing of the solution ionic strength, values of the thermodynamic parameters of EtBr interaction –  $\Delta H$  and  $\Delta S$  increase, while for MB these parameters increase in the interval 0.02 → 0.04, then decrease.

The interaction of groove binding compound Hoechst 33258 with homopolynucleotides poly(rA)-poly(rU) and poly(dA)-poly(dT) was studied at the ionic

strengths 0.02, 0.04 and 0.1 mol as well. The melting curves of the mentioned ligand complexes with NA were shown to display different behavior, depending on the solution ionic strength and ligand/NA concentration ratio. Particularly, at the ionic strength 0.02 mol the melting curves of the complexes poly(rA)-poly(rU)-H33258 acquire double-degreed shape at high concentrations of ligand, while the melting curves of the complexes of these ligands with poly(dA)-poly(dT) are double-degreed at low concentrations of H33258 and become flat at higher concentrations. This phenomenon in the case of poly(dA)-poly(dT) is displayed independently on the ionic strength, while in the case of poly(rA)-poly(rU) a double-degreed melting curve was obtained only at the ionic strength 0.02 mol. It was shown that this fact is both due to formation of three-stranded structure of polynucleotides, induced by H33258 and three-stranded – double-stranded – single-stranded structural transformation. Thermodynamic studies of the interaction of H33258 and netropsin (groove binding ligand) with poly(rA)-poly(rU) have been also carried out that show positive change of enthalpy in the case of H33258 binding and negative change – in the case of netropsin binding. Meanwhile, in the process of complex-formation of H33258 with poly(rA)-poly(rU) the entropic factor contributes more, than that for netropsin complex-formation.