

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄՈՎՍԻՍՅԱՆ ԶՎԱՐԹ ՀՈՎՀԱՆՆԵՄԻ

ՄԻՆԹԵՏԻԿ ՊՈԼԻՌԻԲՈՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ ՀԵՏ ՏԱՐԲԵՐ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ
ԿՈՄՊԼԵՔՍԱԳՈՅԱՑՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գ.00.02-Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների
թեկնածուի հայցման ատենախոսության
ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2023

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МОВСИСЯН ЗВАРТ ОГАНЕСОВНА

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЛИГАНДОВ С
СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ
Ա.Պ. Անտոնյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Վ.Բ. Առաքելյան
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ
Ա.Ա. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Օրբելու անվ. ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2023թ. դեկտեմբերի 5-ին,
ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի
Կենսաֆիզիկայի 051 Մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք
Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի
գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2023թ. հոկտեմբերի 25-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ

Մ.Ա.Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор биол.наук,
доцент А.П. Антонян

Официальные оппоненты:

доктор физ.мат.наук, профессор
В.Б. Аракелян
кандидат биол.наук, доцент А.А. Оганесян

Ведущая организация:

Институт физиологии им. Л.Орбели НАН РА

Защита диссертации состоится 5-го декабря 2023г в 14⁰⁰ 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 25-го октября 2023г.

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

М.А.Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы: В жизнедеятельности клетки главную роль играют биомакромолекулы, особенно нуклеиновые кислоты, которые обеспечивают хранение и реализацию биологической информации. В процессе реализации этой информации активно участвует не только ДНК, но и РНК, внимание к которой в последние десятилетия возрастает в связи с появлением новых данных о ее значении. С этой точки зрения особое место начинают занимать ее гомополинуклеотидные (гомоолигонуклеотидные) тракты, которые функционируют как регуляторные элементы при различных стадиях жизненного цикла клетки. Эти последовательности (тракты) особенно значимы с той точки зрения, что с ними могут специфически связываться многие клеточные белки. При этом, выявлены poly(A)-, poly(C)-специфические белки, а также многофункциональные короткоживущие белки, которые специфически связываются как с poly(G), так и с poly(U) последовательностями (Adepoju & Geiger, 2010).

Молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов, опосредованные гомополинуклеотидными участками РНК все еще не полностью изучены. Однако, эти последовательности могут проявить структурное разнообразие, что позволит разработать соответствующие методы для высечения механизмов регулирования процессов генной экспрессии (Zarudnaya et al, 2019).

ДНК-РНК-белок догма, которая является основной моделью экспрессии генов, предполагает, что синтетические соединения, которые связываются с РНК, должны модулировать продукцию белка. Поскольку экспрессия белка влияет на болезни, распознавание РНК может стать важным подходом к разработке различных лекарственных препаратов. Чтобы сделать концепцию еще более привлекательной, РНК можно применять для комплементарного спаривания с различными НК. Идентификация ведущего соединения, которое может связываться с РНК-мишенью с высоким сродством, может быть такой же простой, как разработка комплементарных олигонуклеотидов, с последующим рутинным синтезом и тестированием, что является также важным для понимания структурно-функциональных свойств нуклеиновых кислот в клетке (Shen & Corey, 2018; Liu, et al, 2016).

Полиморфизм нуклеиновых кислот *in vivo* представляет многочисленные возможности для воздействия терапевтических агентов. Соответственно, дизайн малых молекул, взаимодействующих с неканоническими структурами нуклеиновых кислот представляет собой активную область для рационального дизайна более эффективных лекарственных препаратов (Das et al, 2014).

Среди различных биологически активных молекул важное значение имеют соединения, которые непосредственно могут связываться и с ДНК, и с РНК. В частности, специфические к двухцепочечной (дц-) структуре ДНК интеркалирующие (среди которых бромистый этидий (БЭ), метиленовый синий (МС)) и желобковые соединения (в том числе Hoechst 33258) могут стать хорошими объектами в исследованиях по выявлению структурно-функциональных особенностей оц-олиго- или полирибонуклеотидов, а также влияния лигандов на их гибридизацию с комплементарными цепями РНК, а также ДНК. Эти лиганды примечательны тем, что являются классическими объектами для таких исследований.

Цель диссертационной работы. Целью диссертационной работы явилось исследование взаимодействия специфических к дц-структурам НК лигандов, интеркаляторов БЭ, МС и желобкового соединения Hoechst 33258 с одноцепочечными

poly(rA) и poly(rU) при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М и выяснения их влияния на гибридизацию комплементарных цепей НК.

Задачи диссертационной работы.

Для осуществления указанной цели были поставлены следующие задачи:

- исследовать взаимодействия интеркаляторов бромистого этидия (БЭ), метиленового синего (МС) и желобкового соединения Hoechst 33258 (Н33258) с одноцепочечными (оц-) синтетическими полирибонуклеотидами poly(rA) и poly(rU) методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М, в широком диапазоне фосфат-краситель (P/D);
- изучить связывание БЭ, МС и Н33258 с синтетическими полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU) Определение величин констант связывания БЭ, МС и Н33258 с poly(rA) и poly(rU) при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М;
- исследовать гибридизацию poly(rA) с poly(rU) методом УФ-плавления в отсутствие и присутствии БЭ, МС и Н33258 при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М;

На защиту выносятся:

- Результаты исследований гибридизации poly(rA) с poly(rU) в отсутствие и присутствии БЭ, МС и Н33258;
- Результаты исследований по связыванию БЭ, МС и Н33258 с синтетическими полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU) методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии;
- Результаты исследований по определению величин констант связывания БЭ, МС и Н33258 с poly(rA) и poly(rU) при ионных силах раствора 0,04 и 0,1 М;

Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы.

Полученные в диссертации данные по взаимодействию БЭ, МС и Н33258 являются важными в области исследований по взаимодействию некоторых лигандов с синтетическими одноцепочечными полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU). Эти результаты позволяют выяснить некоторые особенности молекулярных механизмов взаимодействия указанных лигандов с ними и могут стать основой для дальнейших исследований в этом направлении. Литературные данные по взаимодействию различных ДНК-специфических лигандов с оц-полинуклеотидами малочисленны и в основном относятся к poly(rA), в то время как с poly(rU), а также poly(rG) и poly(rC) фактически единичны или не проведены. С этой точки зрения, полученные в данной работе результаты для комплексов указанных лигандов с poly(rA) и poly(rU) можно считать значимыми для дальнейших исследований.

Практическое значение работы заключается в том, что впервые полученные данные выявляют некоторые важные аспекты взаимодействия различных внутриклеточных, а также введенных во внутрь, синтетических биологически активных соединений с оц-участками РНК, с гомонуклеотидными последовательностями. Важно также отметить, что эти данные могут стать основой для разработки и дизайна как более эффективных лекарственных препаратов, так и биоаналитических инструментов – биосенсоров и биочипов на основе РНК.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры биофизики ЕГУ, на XVII международной научной конференции “Актуальные вопросы биол. физики и химии” БФФХ-2022, 19-23 сентября, 2022, (Севастополь, РФ) и VII Съезда Биофизиков России 17-23.04.2023 (Краснодар, РФ).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах и 2 тезиса в материалах на международных конференциях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения и трех глав, изложена на 125 страницах. Диссертация содержит 29 рисунков, 6 таблиц и список цитируемой литературы из 137 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В первой главе представлены литературные данные по структуре рибонуклеиновых кислот, особенно poly(rA) и poly(rU), а также по механизму связывания лигандов с НК.

Во второй главе приведены материалы и методы исследования.

В работе были использованы сверхчистые синтетические полинуклеотиды poly(rA) (P9403), poly(rU) (P9528), интеркалирующие соединения метиленовый синий (МС), бромистый этидий (БЭ), акридиновый оранжевый (АО), желобковое соединение Hoechst 33258 (H33258) (Sigma (США)), бидистиллированная вода, NaCl, Na-цитрат, Na₂EDTA (содержание в рабочих растворах составляло 10⁻⁵ М). Средняя молекулярная масса одноцепочечных (оц-) полинуклеотидов составляла 800÷1000 кДа. Эксперименты проводились при ионных силах раствора 0,04 0,5 М, pH≈7,0, физиологический раствор (sterile apyrogenic) для инъекции (0.154M NaCl) (Liqvor Pharmaceuticals, Armenia), деионизированная вода, resistivity R equal 18.2 MΩ×см (H₂O Economy, LLC, Armenia – US JC). Все препараты использовались без дополнительной очистки.

Концентрации препаратов определялись спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{665}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для МС, $\epsilon_{480}=5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для БЭ, $\epsilon_{257}=10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rA), $\epsilon_{260}=9500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rU), $\epsilon_{490}=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для АО, $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Hoechst 33258.

Приборы: Спектрофотометрические измерения, а также плавление и исследование гибридизации осуществлялись на спектрофотометре UV/VIS Perkin Elmer Lambda 365 (США), Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия) и Perkin Elmer spectrofluorometer (США). При плавлении нагрев термостатируемых ячеек осуществлялся с помощью программного устройства SP 876 Series 2. Для спектроскопических исследований использовали кварцевые кюветы, объемом 1,2 мл, длиной оптического пути 1 см. Спектроскопическое титрование проводилось при комнатной температуре 25⁰С.

В третьей главе представлены основные результаты исследований и их обсуждение, которые приведены ниже.

Флуоресцентные особенности комплексов лигандов МС, БЭ и H33258 с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU). При взаимодействии МС с poly(rA) (а также poly(rU)) наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции лиганда (при 686 нм), со сдвигом в коротковолновую область (гипсохромный сдвиг), по мере увеличения концентрации poly(rA), как это видно из рис. 1 (а). 2D спектры флуоресценции МС и его комплексов с полинуклеотидами, приведенные на этом рисунке, получены при ионной силе раствора 0,1 М. Аналогичные результаты получены при ионной силе раствора 0,04 М (данные не приводятся). Отметим, что

гипсохромный эффект является следствием изменения полярности в непосредственном окружении связанных молекул лиганда (Пирятинский и др., 2011).

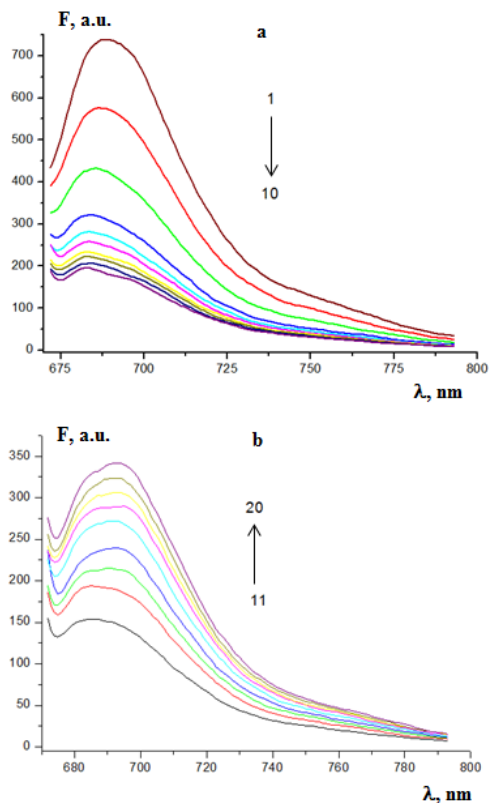


Рис. 1. 2D спектры флуоресценции МС и его комплексов с poly(rA) (а), МС-poly(rA)+poly(rU) (б). Концентрация МС составляла $4,0 \times 10^{-6}$ М, концентрационное соотношение увеличивалось в интервале $0 < r \leq 10$ (на основании в случае poly(rA) и на пару оснований – в случае poly(rA)+poly(rU)). Ионная сила раствора составляла 0,1 М.

Как видно из приведенного рисунка, при достаточно низких концентрациях полинуклеотида имеет место значительное уменьшение интенсивности, при увеличении концентрационного соотношения - $r = \text{poly}(rA)/\text{MC}$ в интервале $0 < r \leq 10$ (на основании). Как видно из рис. 1 (а), при концентрационных соотношениях $r \rightarrow 10$, уменьшение интенсивности флуоресценции становится небольшим. При этом, при больших концентрациях полинуклеотида все молекулы лиганда переходят в полностью связанное состояние, вследствие чего и уменьшение интенсивности флуоресценции фактически прекращается. Полинуклеотиды в растворе представляют собой полианионы, поэтому мы полагаем, что связывание лиганда приводит к изменению полярности, что и вызывает тушение флуоресценции (Lakowicz, 2006). При добавлении poly(rU) в раствор комплексов МС-poly(rA), наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции со сдвигом в длинноволновую область, как это видно из рис. 1 (б). Этот эффект указывает на то, что определенная доля связанных молекул МС из связанного, переходит в свободное состояние, или имеет место перераспределение связанных молекул лиганда.

Эффект уменьшения интенсивности флуоресценции МС имеет место при взаимодействии этого лиганда с дц-ДНК или РНК. Полученный результат мы объясняем исходя из того, что добавление poly(rU) до эквимолярной с poly(rA) концентрации приводит к гибридизации этих полинуклеотидов и образованию дц-структуры, с которой МС связывается двумя способами – полуинтеркаляционным и электростатическим, как и с дц-ДНК (Вардеванян и др. 2013). При исследовании взаимодействия МС, при обратном титровании лиганда полинуклеотидами, также имеют место описанные выше эффекты, однако, понижение интенсивности флуоресценции при связывании МС с poly(rU) существенно меньше, чем при poly(rA). Спектры, полученные при взаимодействии с poly(rU) и МС-poly(rU) + poly(rA), аналогичны спектрам на рис. 1 (поэтому не приведены).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сродство МС к poly(rA) значительно больше, чем к poly(rA)-poly(rU) и к poly(rU). Полученные данные находятся в соответствии с литературными (Ortiz et al, 2011; Hossain & Suresh, 2009; Hossain et al, 2012). На основании полученных результатов мы полагаем, что МС с poly(rA) связывается преимущественно по полуинтеркаляционному типу с проявлением и электростатического взаимодействия, с poly(rU) – наоборот, преобладающим способом связывания является электростатический. Полученные данные также показывают, что особенности связывания МС с гибридным дуплексом poly(rA)-poly(rU), при их смешении в эквимолярном количестве, существенно отличаются от таковых при взаимодействии с отдельными полинуклеотидами.

Получены также спектры флуоресценции комплексов БЭ с этими полинуклеотидами. Спектры флуоресценции БЭ с poly(rA) и poly(rU) приведены на рис. 3 (а) и (б)) соответственно. Концентрация БЭ в растворе, по ходу титрования с poly(rA) и с poly(rU), оставалась постоянной. Из приведенного рисунка видно, что интенсивности флуоресценции возрастала, по мере увеличения концентрации полинуклеотидов, без сдвига максимума длины волны, однако, этот эффект небольшой ($\leq 1,5$). При этом, изменение интенсивности флуоресценции фактически одинаково как при взаимодействии БЭ с poly(rA), так и с poly(rU) (рис. 2 (а) и (б)).

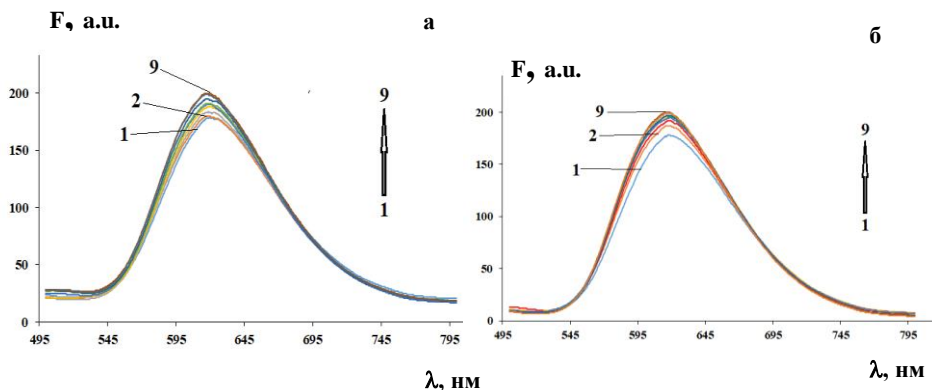


Рис. 2. 2D спектры флуоресценции БЭ (кривые 1) и его комплексов с poly(rA) (а) и poly(rU) (б) (кривые 2-9). Концентрация БЭ составляла $6,0 \times 10^{-6}$ М, концентрационное соотношение γ увеличивалось в интервале $0 < \gamma \leq 10$ (на основании). Ионная сила раствора составляла 0,1 М.

Этот факт указывает на то, что оба полинуклеотида для БЭ являются одинаковыми мишенями. Исходя из вышесказанного мы полагаем, что с poly(rA) и с poly(rU), как и с оц-ДНК БЭ связывается двумя – полуинтеркаляционным и электростатическим способами. Аналогичный эффект имеет место при взаимодействии БЭ с указанными полинуклеотидами при ионной силе раствора 0,04М.

Получены также спектры флуоресценции комплексов БЭ-poly(rA) при титровании раствором poly(rU) (и при титровании комплексов БЭ-poly(rU) раствором poly(rA), а также раствором, содержащим эквимолярное количество poly(rA) и poly(rU)) и обнаружено, что интенсивность флуоресценции возрастает примерно на порядок, по сравнению с изменениями при взаимодействии с отдельными полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU) (спектры аналогичны спектрам на рис. 3, поэтому не приводятся). Степень увеличения интенсивности является отражением того, что имеет место гибридизация между poly(rA) и poly(rU) как в отсутствие, так и в присутствии этого лиганда, вследствие чего образуется дипoly(rA)-poly(rU). В результате этого, полуинтеркалированные, а также свободные молекулы БЭ переходят в полностью интеркалированное состояние, на что указывает и небольшой гипсохромный сдвиг (Lakowicz, 2006).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что БЭ может взаимодействовать и с оц-полинуклеотидами – и с poly(rA), и с poly(rU). При этом, при связывании с ними имеет место увеличение интенсивности флуоресценции. С другой стороны, изменения интенсивностей флуоресценции БЭ при связывании как с poly(rA), так и с poly(rU), схожи, на основании чего мы полагаем, что для этого лиганда оба указанные оц-полинуклеотида являются одинаковыми мишенями.

На рис. 3. приведены спектры флуоресценции комплексов Н33258 с poly(rA) (а) и poly(rU) (б). Из приведенных рисунков видно, что Н33258 также связывается с оц-полинуклеотидами, однако, при связывании с poly(rA) интенсивность флуоресценции возрастает, в то время как при связывании с poly(rU) наоборот, интенсивность флуоресценции уменьшается, по мере увеличения концентрации полинуклеотидов.

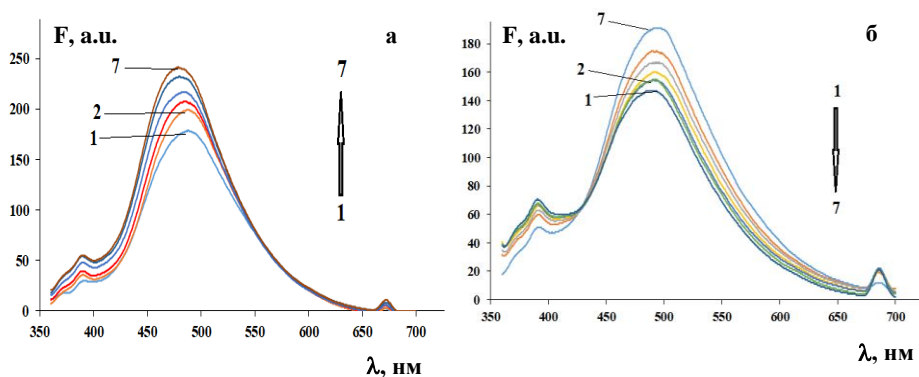


Рис. 3. 2D спектры флуоресценции Н33258 (кривые 1) и его комплексов с poly(rA) (а) и poly(rU) (б) (кривые 2-7). Концентрация Н33258 составляла $6,0 \times 10^{-6}$ М, концентрационное соотношение γ увеличивалось в интервале $0 < \gamma \leq 10$ (на основании). Ионная сила раствора составляла 0,1 М.

Мы полагаем, что этот факт обусловлен структурными различиями, так как poly(rA) имеет высокоупорядоченную структуру, по сравнению с poly(rU). Тем не менее, изменение интенсивности флуоресценции при связывании H33258 с этими полинуклеотидами небольшое. При титровании раствор комплексов H33258-poly(rA) раствором poly(rU) (и наоборот), интенсивность флуоресценции значительно возрастает. Аналогичный эффект наблюдается и при титровании H33258 раствором с эквимольной смесью poly(rA) и poly(rU) (спектры не приводятся). Этот эффект также обусловлен гибридизацией poly(rA) и poly(rU), в результате чего образуется дц-структура. Связывание H33258 с дц-poly(rA)-poly(rU) ранее было выявлено и в работе (Vardevanyan et al, 2020), как и с дц-ДНК (Vardevanyan et al, 2008).

Полученные данные указывают на то, что poly(rU), несмотря на то, что не имеет упорядоченную структуру, как poly(rA), также может стать мишенью для этих лигандов. Полученные данные также выявляют, что БЭ и H33258 не проявляют селективность к poly(rA) или к poly(rU), в то время как МС проявляет таковую к poly(rA). При этом, в случае БЭ и H33258 предпочтительными являются дц-структуры НК, в то время как для МС poly(rA) является более предпочтительной, по сравнению с дц-структурами нуклеиновых кислот.

Изменения в спектрах поглощения МС при комплексообразовании с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU). Взаимодействие МС с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU) исследовалось методом абсорбционной спектроскопии. На рис. 4 приведены полученные спектры поглощения МС (кривая 1), МС-poly(rU) (кривые 2-18), и МС-poly(rU)+poly(rA) (кривые 19-33) (аналогичные спектры получены при обратном титровании, а также при титровании МС раствором poly(rA)-poly(rU); спектры не приводятся). Из приведенного рисунка видно, что имеет место изменение спектров поглощения МС в видимой области (500–750 нм), обусловленное гипохромными и bathochромными эффектами.

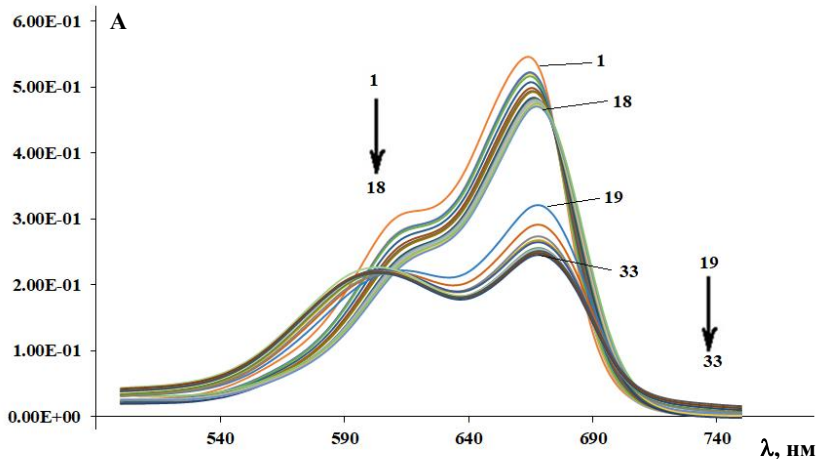


Рис. 4. Спектры поглощения МС (кривые 1), комплексов с оц-poly(rU) (2-18) и МС-poly(rU)+poly(rA) (19-33). Концентрационное соотношение – r=лиганд/фосфат=1/20).

При этом, на спектрах поглощения комплексов МС-poly(rU) (рис. 4) образуется слабо выраженная изобестическая точка – ИТ, что указывает на равновесие между связанными и свободными молекулами красителя (Greger, et al., 2013; Вардеванян и др., 2014). Более значительные изменения обнаруживаются при добавлении в раствор комплексов МС-poly(rU), раствора poly(rA) (до концентрационного соотношения poly(rU):poly(rA)=1:1). В результате этого спектры поглощения резко уменьшаются (рис. 4, кривые 19-33). При этом, уменьшение поглощения комплексов по мере увеличения концентрации poly(rA) в растворе выявляет предпочтительное связывание МС с этим полинуклеотидом. Аналогичный эффект обнаруживается при взаимодействии МС с poly(rA)-poly(rU), из чего следует, что в реальном времени спектральных измерений образуется гибридная дц-структура при добавлении poly(rA) на комплексы МС-poly(rU).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что МС являясь специфическим к дц-НК интеркалирующим лигандом (Vardevanyan, et al. 2019; Nedu et al, 2020), фактически связывается и с оц-РНК. Сильное связывание МС с poly(rA) сопровождается батохромным и гипохромным эффектами в спектрах поглощения. В противоположность этому, при связывании с poly(rU) эти эффекты менее выражены. Полученные данные также показывают, что особенности связывания МС с гибридным дуплексом poly(rA)-poly(rU), при их смешивании в эквимольном количестве существенно отличается от таковых при взаимодействии с отдельными оц-полинуклеотидами.

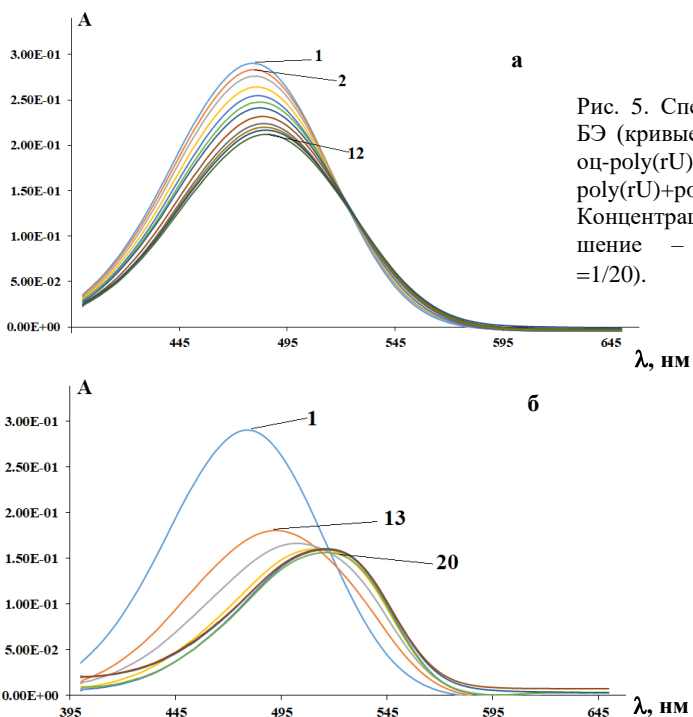


Рис. 5. Спектры поглощения БЭ (кривые 1), комплексов с оц-poly(rU) (2-12) (а) и БЭ-poly(rU)+poly(rA) (13-20) (б). Концентрационное соотношение – Γ =лиганд/фосфат =1/20).

Получены также спектры поглощения комплексов БЭ и Н33258 с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU), которые приведены на рис. 5 и 6. Из рис. 5 видно, что поглощение БЭ уменьшается по мере увеличения концентрации poly(rU) в растворе. При этом, в спектрах комплексов формируется ИТ. Наличие этой точки указывает на то, что один из способов связывания БЭ с оц-полинуклеотидами также осуществляется посредством полуинтеркаляции. Этот факт находится в соответствии с полученными ранее данными по взаимодействию БЭ с ДНК. Как и в случае МС, более значительные изменения обнаруживаются при добавлении в раствор комплексов БЭ-poly(rU), раствора poly(rA) (до концентрационного соотношения poly(rU):poly(rA)=1:1) (рис. 5. (б), кривые 13-20). Примечательно, что образование дц-poly(rA)-poly(rU) в результате гибридизации, приводит к формированию реальной ИТ, со сдвигом в коротковолновую область ($\lambda=515$ нм), как в случае дц-ДНК.

В случае поглощения комплексов Н33258 с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU), спектры поглощения уменьшаются, без длинно- или коротковолнового сдвига (рис. 6). Эти результаты также подтверждают тот факт, что, по ходу титрования комплексов Н33258-poly(rA) (и Н33258-poly(rU)) раствором, содержащим комплементарный полинуклеотид, имеет место гибридизация и образование дц-poly(rA)-poly(rU), с которым Н33258 связывается таким же образом, как с дц-НК.

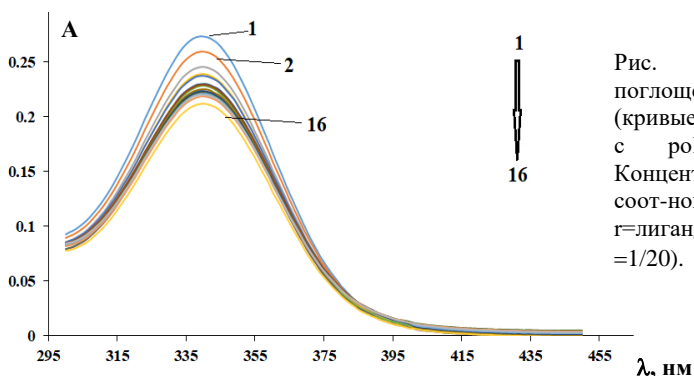


Рис. 6. Спектры поглощения Н33258 (кривые 1), комплексов с poly(rU) (2-16). Концентрационное соотношение г=лиганд/фосфат =1/20).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что Н33258, являясь желобковым лигандом, связывается с оц-НК, у которых фактически отсутствует малый (гликозидный желобок). Полученные данные также указывают на то, что специфические к дц-НК лиганды могут связываться и с оц-полинуклеотидами.

Определение параметров связывания МС, БЭ и Н33258 с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU). Для описания связывания лигандов с указанными полинуклеотидами был применен метод Скотчарда, с помощью которого определялись также параметры связывания МС, БЭ и Н33258 с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU), образовавшегося в результате их гибридизации, на основании спектров поглощения. Для оценки параметров связывания были применены уравнения (1) – (3) (Hossain et al, 2012).

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

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

где ω - коэффициент кооперативности. В случае БЭ и Н33258 эти кривые строились с помощью уравнения (3), для некооперативного связывания:

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

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - (2n-1)r) \quad (3)$$

На рис. 7 приведена кривая связывания МС с poly(rA) (а), построенная по (1).

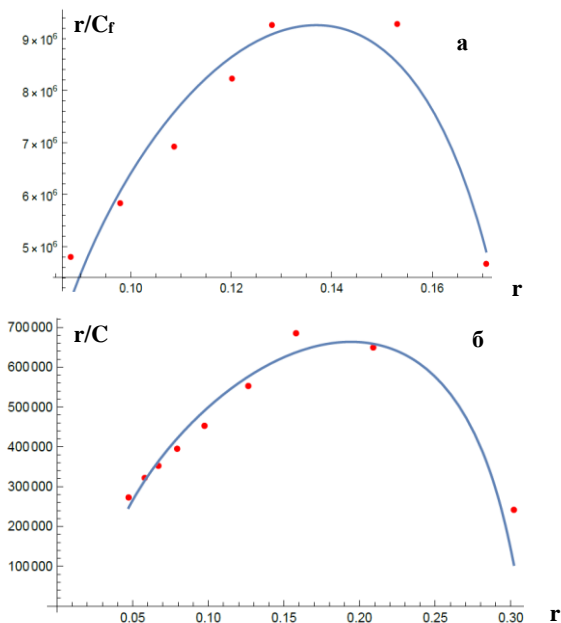


Рис. 7. Кривые связывания МС с poly(A) (а) и poly(A)-poly(U) (б).

Эта кривая отражает кооперативное связывание метиленового синего с poly(rA), со значением фактора кооперативности $\omega \approx 45$. Кооперативность проявляется и при связывании МС с гибридным полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU) (рис. 7, (б)), со значением $\omega \approx 21$. Примечательно, что взаимодействие МС с poly(rU) некооперативное. Более того, кривая связывания, приведенная на рис. 8 (а), непрямолинейная. Эта кривая построена по формуле (2), которая предложена для взаимодействия лигандов с ДНК, с учетом модели исключенных мест связывания. Однако, как видно из рис. 8 (а), анализ экспериментальных точек с помощью уравнения (2) не дает хорошего совпадения. Возможной причиной этого может являться то, что МС с НК взаимодействует по крайней мере двумя способами, вследствие чего и модель исключенных мест связывания не дает хорошего совпадения. Кривые связывания МС с poly(U) двумя способами приведены на рис. 8 (б и в). Как видно, линеаризация дает более хорошее совпадение кривой связывания с экспериментальными точками.

Из кривых связывания МС с оц- и дц-полирибонуклеотидами определены значения констант связывания K и число оснований n , приходящих на одно место связывания в случае оц-, и число пар оснований, в случае дц-полинуклеотидов. Значения K , n и ω , полученные при ионной силе раствора 0,1 М, обобщены в таблице 1. Как видно из табличных данных, значения K при взаимодействии МС с poly(rU), определенные для двух способов связывания, различаются примерно на порядок. При этом, сильный способ соответствует интеркаляционному механизму (Das S., et al, 2014), а слабый - электростатическому. Примечательно, что значение K при связывании МС с poly(rA) на порядок больше, чем при связывании с дц-poly(rA)-poly(rU). Достаточно ограничены и центры адсорбции этого лиганда на poly(rA) ($n_1 \approx 11$), по сравнению с дц-полинуклеотидом (аналогичные исследования проводились при ионной силе раствора 0,04 М, которые находятся в хорошем соответствии с представленными данными, поэтому не приводятся).

Таблица 1.

Значения параметров связывания МС с poly(rA), poly(rU) и дц-poly(rA)-poly(rU), $I=0,1$ М

РНК	$K_1, M^{-1}; 10^6$	$K_2, M^{-1}; 10^6$	n_1	n_2	ω
Poly(rA)	$3,2 \pm 1,0$	-	11	-	45
Poly(rU)	$0,125 \pm 0,005$	$0,018 \pm 0,005$	9	2	1
Poly(rA)-Poly(rU)	$0,21 \pm 0,05$	-	4	-	21

K – константа связывания, n - число оснований, приходящих на одно место связывания, ω - фактор кооперативности. K_1 и n_1 определялись по формуле (1), K_2 и n_2 – по формуле (3).

При анализе экспериментальных точек по связыванию БЭ с указанными полинуклеотидами, кооперативность не выявлена, поэтому анализ проводился с помощью зависимости r/C_r от r по формуле (2), в рамках модели исключенных мест связывания. Проведенный анализ обнаруживал существенное несоответствие экспериментальных точек с теоретическими кривыми, полученными для взаимодействия БЭ с poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU). Мы полагаем, что это обусловлено существованием двух различных способов связывания. Поэтому экспериментальные точки зависимости r/C_r от r нами также анализированы по формуле (3). Из кривых зависимостей определены значения K и n , при наилучшем совпадении теоретических кривых, построенных по формуле (3), с экспериментальными точками, для двух способов связывания.

Как видно из полученных данных, значения K при сильном способе связывания БЭ с poly(rA) больше, чем с poly(rU). В то же время, значение n_1 (соответствует сильному способу), что больше в случае poly(rU). Тем не менее значения n_1 , оцененные для комплексов БЭ с обоими оц-полинуклеотидами, близки. Это указывает на то, что места связывания БЭ на оц-полинуклеотидах сильным способом ограничены. Полученные нами значения констант связывания БЭ с оц-полирибонуклеотидами для этого способа находятся в хорошем соответствии с ранее полученными результатами по взаимодействию БЭ с оц-ДНК (Веселков и др. 1997). В хорошем соответствии находятся также значения K при связывании БЭ с оц- и дц-НК слабым способом,

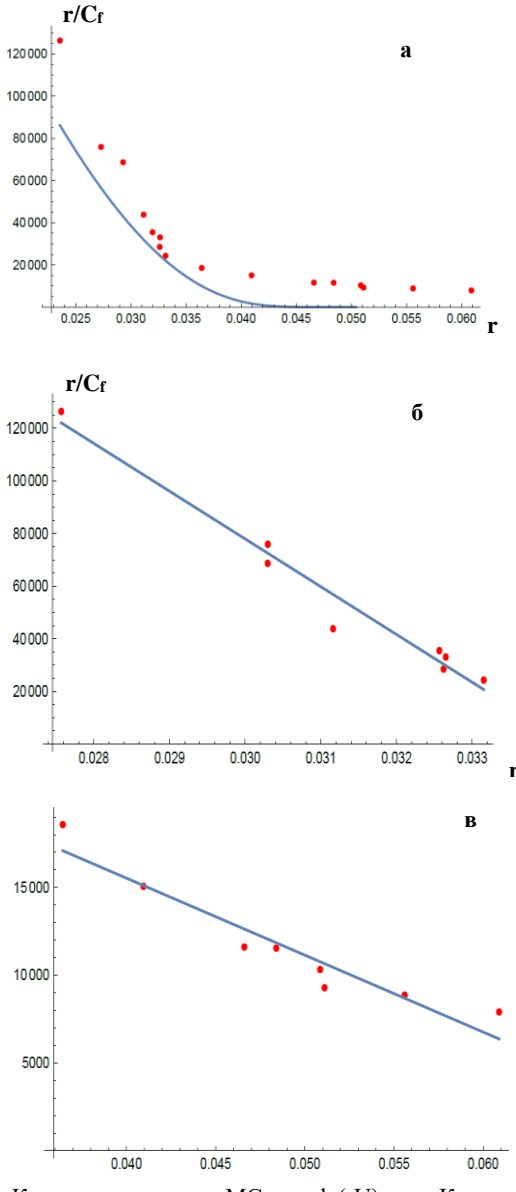


Рис. 8. Кривая связывания МС с $\rho_U(rU)$. а - Кривая построена с помощью уравнения (2). Изотермы адсорбции МС на $\rho_U(U)$ для двух способов связывания получены по формуле (3), б - кривая связывания сильным способом, в - кривая связывания слабым способом.

который осуществляется электростатическим механизмом. Однако значения n_1 и n_2 , полученные как для сильного, так и слабого способов связывания БЭ с оц-полинуклеотидами, существенно больше, чем с оц- или дц-НК.

Мы полагаем, что этот эффект зависит от структурного состояния НК - оц- или дц-; БЭ проявляют большее предпочтение к poly(rA), по сравнению с poly(rU). В то же время, БЭ предпочтительнее взаимодействует с дц-структурой нуклеиновых кислот, как это видно из данных табл. 2. Следовательно, в случае БЭ, предпочтительной мишенью является дц-структура НК. Отметим, что в табл. 2 приведены также значения параметров связывания БЭ с указанными полинуклеотидами, полученными по формуле (2), с учетом исключенных мест связывания. Примечательно, что значения параметров связывания не находятся в хорошем соответствии с литературными данными, в то время как анализ взаимодействия этого лиганда с НК, учитывающий существование по крайней мере двух способов связывания дает более хорошее соответствие с литературными данными. Значения K и n , полученные при ионных силах 0,1 М, представлены в табл. 2 (аналогично, получены соответствующие данные при 0,04М, которые не приводятся).

Таблица 2.

Значения параметров связывания БЭ с poly(rA), poly(rU) и дц-poly(rA)-poly(rU)

I=0,1M РНК	$K_1, M^{-1}; 10^6$	$K_2, M^{-1}; 10^6$	$K, M^{-1}; 10^6$	n_1	n_2	n
Poly(rA)	0.04±0.005	0.0028±0.0005	0.054±0.005	13	10	9
Poly(rU)	0.012±0.005	0,0022±0.0005	0.018±0.005	12	8	10
Poly(rA)-Poly(rU)	0,16±1.0	0,035±0,05	0,1±0.05	3	1,2	2,5

I – ионная сила раствора, K – константа связывания, n - число оснований, приходящих на одно место связывания, K_1 , n_1 , K_2 и n_2 получены по формуле (3), K и n - по формуле (2)

Получены также кривые связывания Н33258 с указанными полинуклеотидами в координатах Скотчарда. Как и в случае БЭ, связывание Н33258 с этими полинуклеотидами некооперативное, при этом, полученные изотермы адсорбции непрямолинейные (кривые не приводятся). Анализ этих кривых также проводился по уравнениям (2) и (3), с помощью которых определялись значения параметров связывания, которые представлены в табл. 3. Из табличных данных выявляется, что Н33258 также проявляет определенное предпочтение к poly(rA), по сравнению с poly(rU). В то же время, наибольшее предпочтение этот лиганд проявляет к гибриднему дц-poly(rA)-poly(rU).

Таким образом, полученные данные показывают, что МС, БЭ и Н33258 более предпочтительной мишенью является poly(rA), по сравнению с poly(rU). При этом, при взаимодействии с poly(rA), а также с poly(rA)-poly(rU), МС проявляет высокую кооперативность, в то время как в случае БЭ и Н33258 кооперативность не проявляется (Giri & Kumar, 2008). В случае БЭ и Н33258 отсутствие кооперативности указывает на то, что конформационные изменения менее значительные, чем при

связывании МС с poly(rA) и poly(rA)-poly(rU). При взаимодействии же указанных лигандов с poly(rU) кооперативность также отсутствует, что указывает на то, что конформационные изменения при связывании МС, БЭ и Н33258 с ним практически не имеют место. Тем не менее, как с poly(rA) и дц-poly(rA)-poly(rU), так и с poly(rU) все три лиганда связываются по крайней мере двумя способами – полуинтеркаляционным и электростатическим, как это выявляется на основании Скетчард анализа.

Таблица 3.

Значения параметров связывания Н33258 с poly(rA), poly(rU) и дц-poly(rA)-poly(rU)

I=0,1M RNA	$K_1, M^{-1}; 10^6$	$K_2, M^{-1}; 10^6$	$K, M^{-1}; 10^6$	n_1	n_2	n
Poly(rA)	0,5±0,5	0,07±0,05	0,22±0,05	6	2,5	3
Poly(rU)	0,1±0,05	0,011±0,005	0,08±0,005	5	1,5	4
Poly(rA)-Poly(rU)	0,75±0,05	0,1±0,05	0,4±0,05	4,5	1,2	1,1

I – ионная сила раствора, K – константа связывания, n – число оснований, приходящих на одно место связывания, K_1 , n_1 , K_2 и n_2 получены по формуле (3), K и n – по формуле (2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование по взаимодействию интеркалирующих лигандов МС, БЭ и желобково связывающего соединения Н33258 с poly(rA), poly(rU) и образовавшегося в результате гибридизации poly(rA)-poly(rU). Выявлено, что смешивание комплементарных полинуклеотидов poly(rA) и poly(rU) приводит к гибридизации и образованию poly(rA)-poly(rU). Флуориметрические исследования выявили, что эти лиганды образуют комплексы как с одноцепочечными, так и с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами. При этом, в случае связывания МС с poly(rA) имеет место значительное снижение интенсивности флуоресценции, по сравнению с poly(rU). В случае БЭ такая особенность не наблюдалась, поскольку изменения интенсивности флуоресценции фактически одинаковы. В случае Н33258 интенсивность флуоресценции, при связывании с poly(rA) возрастала, в случае poly(rU) наоборот, интенсивность уменьшалась.

Эти данные указывают на то, что при взаимодействии МС с poly(rA) и poly(rU), а также Н33258 с poly(rU) имеет место тушение флуоресценции, в то время как при взаимодействии Н33258 с poly(rA), а также БЭ с poly(rA) и poly(rU) имеет место возрастание интенсивности флуоресценции. При образовании дц-структуры в результате гибридизации, в случае БЭ и Н33258 наблюдалось возрастание интенсивности флуоресценции. Оба лиганда являются специфическими к дц-структуре НК, при связывании с которой имеет место увеличение спектров флуоресценции (Антонян А.П., 2017; Vardevanyan P.O., et al, 2008).

В случае МС имеет место уменьшение интенсивности флуоресценции, однако, при образовании дц-структуры poly(rA)-poly(rU), некоторая доля связанных с оц-полинуклеотидами молекул этого лиганда диссоциирует, вследствие чего имеет место возрастание интенсивности флуоресценции, в то время как при взаимодействии

МС с гибридной poly(rA)-poly(rU), а также с дц-НК, интенсивность флуоресценции также уменьшается.

Полученные данные также показывают, что особенности связывания МС с гибридным дуплексом poly(rA)-poly(rU), при смешивании poly(rA) и poly(rU) в эквимольном количестве, существенно отличаются от таковых при взаимодействии с отдельными оц-полинуклеотидами. Так, выявлено, что образование дц-структуры poly(rA)-poly(rU) приводит к ограничению мест связывания полуинтеркаляционным способом, вследствие чего определенное количество связанных с оц-полинуклеотидами, в основном с оц-poly(rA) молекул лиганда высвобождается, что сопровождается гиперхромным эффектом спектров поглощения и увеличением интенсивности флуоресценции.

Обнаружено, что МС проявляет ярко выраженную предпочтительность к poly(rA), по сравнению с poly(rU) и poly(rA)-poly(rU), в то время как БЭ проявляет предпочтительность к дц-poly(rA)-poly(rU), а предпочтительность к poly(rA), по сравнению с poly(rU) небольшое. Полученные данные по взаимодействию Н33258 с poly(rA) и poly(rU) указывают на то, что, являясь желобковым соединением, этот лиганд связывается и с оц-НК, у которых фактически отсутствует малый (гликозидный желобок). Более того, специфичный к В-форме ДНК лиганд Н33258 образует комплексы и с оц-, и с дц-полирибонуклеотидами, несмотря на то, что особенности малого и большого желобков А- и В- форм НК различаются.

Полученные данные выявили, что для всех трех лигандов более предпочтительной мишенью является poly(rA), по сравнению с poly(rU). С другой стороны, при взаимодействии с poly(rA), а также с poly(rA)-poly(rU) МС проявляет высокую кооперативность, БЭ и Н33258 кооперативность не проявляют. Больше предпочтение этих лигандов к poly(rA), по всей вероятности, обусловлено высокой упорядоченностью структуры этого полинуклеотида (Giri P. & Kumar G.S., 2008). При взаимодействии указанных лигандов с poly(rU) кооперативность не проявляется, что обусловлено тем, что структура этого полинуклеотида менее упорядочена, вследствие чего конформационные изменения при связывании МС, БЭ и Н33258 с ним практически не имеют место.

Таким образом, обобщая вышеизложенное можно утверждать, что исследованные лиганды с оц-полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU), а также дц - poly(rA)-poly(rU) связываются по крайней мере двумя способами – полуинтеркаляционным и электростатическим, как это выявляется на основании Скетчард анализа. При этом, при взаимодействии БЭ с двухцепочечным poly(rA)-poly(rU) имеет место также интеркаляционный способ связывания.

ВЫВОДЫ

1. БЭ в большей степени, по сравнению с МС, стимулирует скорость гибридизации poly(rA) и poly(rU) и стабилизирует образовавшуюся дц-poly(rA)-poly(rU). Н33258, проявляющий сродство к дц-структуре НК, практически не влияет на гибридизацию poly(rA) и poly(rU). Процесс гибридизации и сродство БЭ и МС зависят от ионной силы раствора и эти процессы значительно эффективнее протекают при ионной силе 0,04 М.
2. МС, являясь специфическим интеркалирующим лигандом для дц-НК, связывается также с оц-РНК. При этом, сильное связывание этого лиганда с оц-poly(rA) сопровождается батохромным и гипохромным эффектами в спектрах поглощения и значительным снижением интенсивности флуоресценции, в то время как эти эффекты в случае poly(rU) выражены в меньшей степени.
3. Спектроскопические исследования указывают на то, что сродство МС к оц-poly(rU), по сравнению с оц-poly(rA) значительно меньше. Это обусловлено тем, что МС с оц-poly(rA) связывается полуинтеркаляционным, а также электростатическим способами, в то время как с оц-poly(rU) этот лиганд связывается в основном электростатическим способом.
4. На спектрах поглощения в случае БЭ, который одновременно образует интеркаляционные и полуинтеркаляционные комплексы с дц-НК, формируется реальная изобестическая точка. В случае МС формируется псевдоизобестическая точка при комплексообразовании только с оц-poly(rU).
5. МС с оц-poly(rA) связывается кооперативно, в то время как с оц-poly(rU) кооперативность не проявляется. Кооперативность не проявляется и при связывании БЭ и Н33258 с этими полинуклеотидами. При этом, все три лиганда с poly(rA) и poly(rU) связываются по крайней мере двумя способами.
6. БЭ, МС и Н33258, являющиеся специфическими к В-семейству НК, образуют прочные комплексы и с дц-, и оц-структурами РНК, являющейся представителем А-семейства нуклеиновых кислот. При этом, МС и БЭ облегчают гибридизацию комплементарных нитей РНК и могут стать эффективными лигандами для усиления выходного сигнала РНК-геносensors/геночипов, в то время как Н33258 не влияет на гибридизацию, несмотря на то, что проявляет предпочтение к дц-структурам НК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Shahinyan M.A., Movsisyan Z.H., Hovhannisyan G.G., Vardevanyan P.H. Absorption and fluorescence spectra of the complexes of methylene blue and acridine orange with poly(rA)- poly(rU). Proc. of the YSU, Chem. and Biol., 2021, 55(2), p. 151-157.
2. Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Movsisyan Z.H., Antonyan A.P. Binding peculiarities of poly(rA)-poly(rU) with minor groove ligand Hoechst 33258. Proc. of The YSU, Chem. and Biol., 2021, 55(2), p. 144-150.
3. Антонян А.П., Парсаданян М.А., Мовсисян З.О., Шиладжян А.А., Григорян К.Р., Вардеванян П.О. Особенности связывания метиленового синего с одноцепочечными синтетическими полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU). Материалы XVII международной научной конференции, Актуальные вопросы биол. физики и химии, БФФХ-2022, 19-23 сентября, 2022, Севастополь, РФ, с. 103-104.
4. Антонян А.П., Мовсисян З.О., Парсаданян М.А., Вардеванян П.О. Взаимодействие метиленового синего с одноцепочечными полинуклеотидами poly(rA), poly(rU) и с двухцепочечным полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU). Актуальные вопросы биол. физики и химии, т. 7 N2, 2022, с. 251-255.
5. Movsisyan Z.H. Study of the interaction of single-stranded polyriboadenylic acid with ethidium bromide and methylene blue. Proc. of The YSU, Chem. and Biol., 2022, 56(3), p. 231-238.
6. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Movsisyan Z.H., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Grigoryan K.R., Shilajyan H.A. Study of complexation of single-stranded poly(rA) and poly(rU) with methylene blue. J. of Biomol. Struct and Dyn., 2023, doi.org/10.1080/07391102.2023.2189475
7. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Мовсисян З.О. Степень сродства Бромистого этидия и Метиленового Синего к одноцепочечной полирибоадениловой кислоте. Сборник Научных трудов VII Съезда Биофизиков России: т. 1, 17-23.04.2023, 2023, Краснодар, РФ, с. 113-114.
8. Movsisyan Z.H. Study of hybridization of complementary single-stranded polynucleotides poly(rA) and poly(rU). Proc. of The YSU, Chem. and Biol., Vol. 57 No. 2 (261) (2023). p. 126-132. DOI:<https://doi.org/10.46991/PYSU:B/2023.57.2.126>.
9. Мовсисян З.О., Антонян А.П., Вардеванян П.О. Механизм связывания метиленового синего с одноцепочечными синтетическими полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU). Журнал Прикладной Спектроскопии, 2023, т. 90, N4, с. 547-552.

ՄՈՎՄԻՍՅԱՆ ԶՎԱՐԹ ՀՈՎՀԱՆՆԵՄԻ

ՄԻՆԹԵՏԻԿ ՊՈԼԻՌԻԲՈՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ ՀԵՏ ՏԱՐԲԵՐ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ
ԿՈՄՊԼԵՔՍԱԳՈՅԱՑՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU), մեթիլենային կապույտ, էթիդիոլմի բրոմիդ, Hoechst 33258, ինտերկալյացիա, կիսահինտերկալյացիա, էլեկտրաստատիկ մեխանիզմ, կապման հաստատուն, ֆլուորեսցենցիայի սպեկտր, կլանման սպեկտր

Ներկայացվող աշխատանքում ուսումնասիրվել է poly(rA), poly(rU) և դրանց հիբրիդացման արդյունքում ձևավորվող poly(rA)-poly(rU) պոլինուկլեոտիդների հետ ինտերկալյատորներ մեթիլենային կապույտի (ՄԿ) և էթիդիոլմի բրոմիդի (ԷԲ), ինչպես նաև ակոսային կապվող Hoechst 33258 (H33258) միացության փոխազդեցությունը: Բացահայտվել է, որ իրար լրացական poly(rA) և poly(rU) պոլինուկլեոտիդների հավասարամուլային խառնման դեպքում դրանք առաջացնում են հիբրիդային երկշղթա poly(rA)-poly(rU): Ֆլուորեսցենտային հետազոտությունները բացահայտել են, որ նշված լիգանդները առաջացնում են համալիրներ ինչպես միաշղթա, այնպես էլ երկշղթա պոլինուկլեոտիդների հետ: Ընդ որում, poly(rA)-ի հետ ՄԿ-ի դեպքում տեղի է ունենում ֆլուորեսցենցիայի զգալի նվազում, ի տարբերություն poly(rU)-ի կապման: ԷԲ-ի դեպքում այդպիսի առանձնահատկություն չի դրսևորվել, քանի որ և՛ poly(rA)-ի, և՛ poly(rU)-ի հետ կապվելիս տեղի է ունեցել ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության մեծացում:

Մյուս կողմից, poly(rA)-H33258 համալիրների դեպքում տեղի է ունեցել ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության մեծացում, poly(rU)-H33258 համալիրների դեպքում՝ նվազում: Այս տվյալները ցույց են տալիս, որ poly(rA)-ի և poly(rU)-ի հետ ՄԿ-ի, ինչպես նաև poly(rU)-ի հետ H33258-ի փոխազդեցության դեպքում տեղի է ունենում ֆլուորեսցենցիայի մարում, մինչդեռ այդ պոլինուկլեոտիդների հետ ԷԲ-ի կապման դեպքում ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճ է տեղի ունենում: Երկշղթա կառուցվածքի առաջացման դեպքում, ԷԲ-poly(rA)-poly(rU), H33258-poly(rA)-poly(rU) համալիրների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը աճում է: Այդ երկու լիգանդները նախընտրելիորեն են կապվում երկշղթա նուկլեինաթթուների (ՆԹ) հետ, որի արդյունքում ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը աճում է: ՄԿ-ի դեպքում ընդհակառակը, ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը նվազում է ինչպես երկշղթա, այնպես էլ միաշղթա ՆԹ-ի հետ փոխազդելիս: Սակայն, միաշղթա պոլինուկլեոտիդների հետ կապված ՄԿ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը սկսում է աճել՝ կապված հիբրիդացման արդյունքում poly(rA)-poly(rU)-ի առաջացմամբ:

Ստացված տվյալները նաև վկայում են, որ հիբրիդային երկշղթա poly(rA)-poly(rU)-ի ՄԿ-ի կապման առանձնահատկությունները տարբերվում են

երկշղթա և միաշղթա ՆԹ-ի հետ այդ լիգանդի փոխազդեցության առանձնահատկություններից: Դրանով է պայմանավորված այն, որ միաշղթա պոլիմուկլեոտիդների վրա ՄԿ-ի կիսաինտերկալացիոն եղանակով կապման կենտրոններն ավելի են, քան հիբրիդային երկշղթա պոլիմուկլեոտիդի վրա: Ուստի, հիբրիդացման արդյունքում այդ եղանակով կապված մուկլեուլների որոշ մասը անջատվում է, ինչն էլ հանգեցնում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճի: Ընդ որում, ՄԿ-ը ցուցաբերում է արտահայտված նախընտրելիություն poly(rA)-ի նկատմամբ, համեմատած poly(rU)-ի և poly(rA)-poly(rU)-ի հետ: Մինչդեռ ԷԲ-ն և H33258-ը նախընտրելիություն են ցուցաբերում poly(rA)-poly(rU)-ի նկատմամբ: Մյուս կողմից H33258-ը, լինելով ակոսային կապվող լիգանդ, փոխազդում է նաև միաշղթա պոլիմուկլեոտիդների հետ, որոնք, ըստ էության, չունեն փոքր ակոս, որում կապվում է այդ միացությունը:

Ստացված տվյալները նաև բացահայտում են, որ այդ երեք լիգանդների դեպքում էլ ավելի նախընտրելի թիրախ է միաշղթա poly(rA)-ն, poly(rU)-ի համեմատ: Մյուս կողմից, poly(rA)-ի, ինչպես նաև poly(rA)-poly(rU)-ի հետ ՄԿ-ը փոխազդում է կոոպերատիվորեն, մինչդեռ ԷԲ-ի և H33258-ի դեպքում կոոպերատիվություն չի դրսևորվում: Մյուս կողմից, poly(rA)-ի նկատմամբ այդ լիգանդների նախընտրելիությունը պայմանավորված է պոլիմուկլեոտիդի կառուցվածքի բարձր կազմավորվածությամբ: Նշված լիգանդների փոխազդեցությունը poly(rU)-ի հետ ոչ կոոպերատիվ է, քանի որ այդ պոլիմուկլեոտիդի կառուցվածքը ավելի զգալիորեն փոքր կարգավորվածություն ունի, ուստի ՄԿ-ի, ԷԲ-ի և H33258-ի կապման դեպքում կառուցվածքային փոփոխություններ գրեթե տեղի չեն ունենում: Այնուամենայնիվ, poly(rA) poly(rU) և poly(rA)-poly(rU) պոլիմուկլեոտիդների հետ երեք լիգանդներն էլ կապվում են առնվազն երկու եղանակներով, ինչպես դա ի հայտ է եկել Սկետչարդի մեթոդով վերլուծության հիման վրա:

MOVSISYAN ZVART HOVHANNES

STUDY OF COMPLEX-FORMATION OF VARIOUS LIGANDS WITH SYNTHETIC POLYRIBONUCLEIC ACIDS

SUMMARY

Keywords: poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU), methylene blue, ethidium bromide, Hoechst 33258, intercalation, semi-intercalation, electrostatic mechanism, binding constant, fluorescence spectrum, absorption spectrum

In the presented work the interaction of intercalators methylene blue (MB) and ethidium bromide (EtBr), as well as groove binding compound Hoechst 33258 (H33258) with poly(rA), poly(rU) and poly(rA)-poly(rU), resulted from their hybridization, has been studied. It was revealed that in the case of equal-molar mixing of complementary poly(rA) and poly(rU) polynucleotides, a hybrid double-stranded poly(rA)-poly(rU) is formed.

Fluorescence studies showed that the mentioned ligands form complexes with both single-stranded and double-stranded polynucleotides. Meanwhile, when MB binds to poly(rA), a significant decrease of fluorescence occurs, in spite of binding to poly(rU). For EtBr there is no such a peculiarity, since at the binding to both poly(rA) and poly(rU) an increase of fluorescence intensity takes place. On the other hand, for the complexes poly(rA)-H33258 an increase of fluorescence intensity takes place, while for the complexes poly(rU)-H33258 – a decrease. These data showed that at the interaction of MB with poly(rA) and poly(rU), as well as of H33258 with poly(rU), the fluorescence quenches, although, at the binding of EtBr to these polynucleotides, there occurs an increase of the fluorescence intensity. In the case of double-stranded structure formation, the fluorescence intensity of the complexes EtBr-poly(rA)-poly(rU) and H33258-poly(rA)-poly(rU) increases. These two ligands preferentially bind to double-stranded nucleic acids (NA), as a result of which the fluorescence intensity increases. For MB, vice versa, the fluorescence intensity decreases at the interaction with both double-stranded and single-stranded NA. Though, the fluorescence intensity of MB, bound to single-stranded polynucleotides, starts increasing – connected to formation of poly(rA)-poly(rU), resulted from hybridization.

The obtained data also indicate that the binding peculiarities of MB to hybrid double-stranded poly(rA)-poly(rU) differ from those of this ligand to double-stranded and single-stranded NA. Due to this fact binding centers on single-stranded polynucleotides for MB by semi-intercalation mode are more in number, as compared to those on hybrid double-stranded polynucleotide. Hence, in the result of hybridization, some part of bound molecules by this mode is broken off, which leads to increasing of the fluorescence intensity. Though, MB shows an expressed preference toward poly(rA), compared to poly(rU) and poly(rA)-poly(rU), although, EtBr shows a preference toward poly(rA)-poly(rU). On the other hand, H33258, being a groove binding ligand, interacts with single-stranded polynucleotides as well that, apparently, do not have minor groove, to which would bind this compound.

The received data also reveal that in the case of three ligands poly(rA) is much more preferable target, than poly(rU). On the other hand, MB interacts with poly(rA), as well as with poly(rA)-poly(rU) cooperatively, while EtBr and H33258 do not show cooperativeness. On the other hand, the preference of these ligands to poly(rA) is conditioned by high organization of polynucleotide structure. Interaction of the mentioned ligands with poly(rU) is non-cooperative, since the structure of this polynucleotide is significantly less ordered that is why at the binding of MB, EtBr and H33258 structural changes almost do not occur. However, the three ligands bind to poly(rA), poly(rU) and poly(rA)-poly(rU) at least by two modes, as it was based on the analysis by Scatchard's method.