

ՀՀ ԳԱԱ Ա.Բ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆԻ ԱՆՎԱՆ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՖԻԶԻԿԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԿԱՐԵՆ ՅՈՒՐԻԿԻ ԱՄԻՐԲԵԿՅԱՆ

**НОЕЧНСТ 33258-Ի և ԴՐԱ ՆՈՐ ԱՇԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ՀԵՏ ԴՆԹ-Ի ՓՈՒԱԶՂԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Բ.00.04 – “Ֆիզիկական քիմիա” մասնագիտությամբ քիմիական գիտությունների
թեկնածուի զիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան-2016

ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. А.Б. НАЛБАНДЯНА НАН РА

АМИРБЕКЯН КАРЕН ЮРИКОВИЧ

**ФИЗИКОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НОЕЧНСТ 33258 И
ЕГО НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ С ДНК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальности
02.00.04-“Физическая химия”

Ереван-2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝ քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Շ. Ա. Մարգարյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ քիմ. գիտ. դոկտոր Պ.Ս. Ղուկասյան

Ֆիզ-մաթ. գիտ. թեկնածու, դոցենտ Գ.Վ. Անանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Խ. Աբովյանի անվան հայկական պետական
մանկավարժական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2016թ. հունիսի 2-ին, ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Ա.Բ. Նալբանդյանի անվան Քիմիական ֆիզիկայի ինստիտուտում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի 017 «Ֆիզիկական և անօրգանական քիմիա» մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Պ. Սևակի փող., 5/2):

Ատենախոսությունը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Քիմիական ֆիզիկայի ինստիտուտի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2016թ. մայիսի 2-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
քիմիական գիտությունների թեկնածու



Հ. Գ. Հակոբյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете.

Научный руководитель: доктор хим. наук, профессор Ш.А. Маркарян

Официальные оппоненты: доктор хим. наук, П.С. Гукасян
кандидат физ-мат. наук, доцент Г.В. Ананян

Ведущая организация: Армянский государственный педагогический университет
им. Х. Абовяна

Защита диссертации состоится “2” июня 2016 г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 017 ВАК РА "Физическая и неорганическая химия", действующего при Институте химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН РА (0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической физики НАН РА.

Автореферат разослан “2” мая 2016 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат химических наук



А. Г. Акопян

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Թեմայի արդիականությունը

Ժամանակակից ֆիզիկական քիմիայի առաջընթացը հնարավորություն է տալիս բազմակողմանիորեն նկարագրել ոչ միայն պարզ քիմիական համակարգերը, այլև կենսաբանական համակարգերը, հանձինս ԴՆԹ-ն և սպիտակուցները: Մպեկտրոսկոպիական մեթոդները հնարավորություն են տալիս նկարագրել կենսամոլեկուլների հետ տեղի ունեցող կառուցվածքային փոփոխությունները տարբեր գործոնների ազդեցության հետևանքով: Մասնավորապես մեծ կարևորություն է ներկայացնում լիզանդների և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Այսպիսի հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ որոշ միացություններ կարող են ազդել գենային արտահայտման վրա՝ ինհիբիցելով կարգավորող սպիտակուցների կապումը ԴՆԹ-ին: Գեների արտահայտման ղեկավարումը խթանեց մի շարք նոր հետերոցիկլիկ միացությունների սինթեզը և ԴՆԹ-ի հետ դրանց կապման հետազոտությունները:

ԴՆԹ-ի փոքր ակոսներին կապվող լիզանդները, ինչպիսին են Hoechst 33228-ը, դիստիմիդինը, տրիպիրոլ պեպտիդը և այլն, կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսների հետ առնվազն չորս ադենին-թիմին հիմնային զույգեր պարունակող հատվածներում: ԴՆԹ-ի այն հատվածները, որոնք հարուստ են ադենին-թիմին հիմնային զույգերով, կարևոր դեր են կատարում էուկարիոտ օրգանիզմների (բույսերի և կենդանիների) գենոմի կառուցվածքի գոյացման տարբեր փուլերում: Դրանք կարգավորում են նաև այդ գենոմի տարբեր ֆունկցիաները: Նշված պրոցեսներին հնարավոր է հետևել սպեկտրոսկոպիական տարբեր մեթոդներով, որոնցից կարելի է նշել ֆլուորեսցենց սպեկտրոսկոպիան: Քանի որ նշված լիզանդները օժտված են ֆլուորեսցենցելու հատկությամբ և մեծ զգայունությամբ շրջապատի փոփոխությունների նկատմամբ, ապա հետևելով նրանց ֆլուորեսցենց հատկությունների փոփոխությանը, կարելի է պատկերացում կազմել ԴՆԹ-ի, ՌՆԹ-ի, ռեպլիկացիային մասնակցող տարբեր սպիտակուցների հետ կատարվող փոփոխությունների մասին: Վերջին տարիներին մեծ ուշադրություն է դարձվում ԴՆԹ-ի կապման ուսումնասիրությանը տարբեր կառուցվածք ունեցող ֆլուորեսցենտային միացությունների հետ: Այս հետազոտությունները թույլ են տալիս տեղեկություն ստանալ ԴՆԹ-ում ազոտային հիմքերի հաջորդական դասավորության մասին, ԴՆԹ-ում վնասվածքների առկայության մասին և կատարել քանակական հետազոտություններ ԴՆԹ-ում ադենին-թիմին և գուանին ցիտոզին հիմքերի հարաբերական պարունակության որոշման համար: Նշված լիզանդերից լայնորեն ուսումնասիրված է Hoechst 33258-ը, որը հանդիսանում է ֆլուորեսցենտային նշանակիր և պոտենցյալ հակաքաղցկեղային դեղամիջոց: Hoechst 33258-ի հետ կատարված ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ

այն օժտված է ԴՆԹ-ի հետ կապման հաստատունի մեծ արժեքով և ունի արտահայտված բարձր խնամակցություն ԴՆԹ-ի աղենին և թիմին ազոտային հիմքերի նկատմամբ: Գրականության մեջ քիչ է ուսումնասիրված ԴՆԹ-Hoechst 33258 փոխազդեցությունը ջուր-օրգանական խառը լուծիչներում: Ավելին, հիմնվելով Hoechst 33258-ի յուրահատուկ կառուցվածքի վրա, ներկայումս իրականացվում են բազմաթիվ հետազոտություններ, որոնք ուղղված են նրա նոր ածանցյալների սինթեզին և ԴՆԹ-ի հետ նրանց փոխազդեցության ուսումնասիրությանը: Ուստի սույն աշխատանքում իրականացված Hoechst 33258-ի նոր ածանցյալների և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրումը խիստ արդիական է:

Մինչև ժամանակ կարևոր է նշել գրականության մեջ հայտնի և բազմակողմանիորեն ուսումնասիրված ֆլուորեսցենտային նշանակիր էթիդիումի բրոմիդի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Ի տարբերություն Hoechst 33258-ի, էթիդիումի բրոմիդը կապվում է ԴՆԹ հետ ինտերկալացիոն մեխանիզմով և նրա լուծույթների ուսումնասիրությունը շարունակում է մնալ բազմաթիվ գիտական լաբորատորիաների ուշադրության կենտրոնում:

Սույն ատենախոսությունը իր մեջ ներառում է Hoechst 33258-ԴՆԹ համակարգի և նրա ածանցյալների բազմակողմանի ուսումնասիրությունը ջուր-դիմեթիլսուլֆօքսիդ խառը լուծիչներում կլանման էլեկտրոնային, ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի և տեսական մեթոդների համատեղմամբ: Այն ընդգրկում է նաև ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով:

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս բացահայտել ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցության առանձնահատկությունները և կիրառվում են մշակելու համար տարբեր մեթոդներ՝ կառավարելու նշված փոխազդեցությունները:

Աշխատանքի նպատակը

Սույն ատենախոսության նպատակն է պարզել ԴՆԹ-Hoechst 33258 փոխազդեցության առանձնահատկությունները առանց դիմեթիլսուլֆօքսիդի (ԴՄՍՕ) և ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ սպեկտրոսկոպիական մեթոդների համատեղմամբ: Աշխատանքի նպատակներից է նաև ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով: Աշխատանքը իր մեջ ներառում է Hoechst 33258-ի նոր ածանցյալների և տարբեր ԴՆԹ-ների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը և ԴՆԹ-ների նկատմամբ նրանց խնամակցության գնահատումը՝ բացահայտելու համար նշված լիզանդների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ հատկությունների վրա: Նշված նպատակների իրականացումը

հնարավորություն է ընձեռում կառավարելու ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցությունը և նոր մեթոդներ մշակել՝ նվազեցնելու համար ցածրամոլեկուլային միացությունների կողմնակի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի կառուցվածքի վրա:

Դրված նպատակին հասնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- Ուսումնասիրել ԴՆԹ-ի ջերմային կայունությունը առանց Hoechst 33258-ի (կոնտրոլ) և Hoechst 33258-ի առկայությամբ փոփոխելով լուծույթում ԴՄՍՕ-ի պարունակությունը:
- Ի հայտ բերել համակարգում գործող միջմոլեկուլային փոխազդեցությունները, որոնք հանգեցնում են լուծույթում ԴՆԹ-ի կայունության փոփոխությանը:
- Քանակապես նկարագրել Hoechst 33258-ԴՆԹ կապումը ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ՝ որոշելով նրանց միջև կապման հաստատունի արժեքները:
- Ուսումնասիրել ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ փոխազդեցությունը ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի միջոցով:
- Ուսումնասիրել Hoechst 33258-ի նորագույն ածանցյալների փոխազդեցությունը տարբեր ԴՆԹ-ների հետ, որոշել նրանց խնամակցությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ:

Գիտական նորույթը

Աշխատանքում առաջին անգամ իրականացվել է ԴՆԹ-ի հետ Hoechst 33258-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ: Ատենախոսությունը իր մեջ ներառում է էթիդիումի բրոմիդի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով: Առաջին անգամ իրականացվել է Hoechst 33258-ի նոր ածանցյալների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ԴՆԹ-ի հետ և որոշվել են նրանց խնամակցությունները ԴՆԹ-ի նկատմամբ:

Կիրառական նշանակությունը

Սույն ատենախոսության տվյալները կարող են կիրառվել կենսաքիմիական հետազոտություններում, որտեղ առկա է անհրաժեշտություն ուսումնասիրելու համակարգը օրգանական հավելանյութերի առկայությամբ: Կատարված հետազոտությունները ի հայտ են բերում ԴՆԹ-լիզանդ-ԴՄՍՕ

համակարգում միջմուլեկուլային փոխազդեցությունները և սուլֆօքսիդների կենսաբժշկական ազդեցության մեխանիզմները: Ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով իրականացված չափումները ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ համակարգի հետ թույլ են տալիս մշակել նոր մեթոդներ ուսումնասիրելու համար ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցությունը: Hoechst 33258-ի նոր ածանցյալները կարող են կիրառվել ինչպես անալիտիկ նպատակներով որպես ԴՆԹ-ի նշանակիր, այնպես էլ կենսաբժշկական նպատակներով:

Արդյունքների փորձարկում

Ատենախոսության մի շարք դրույթներ ներկայացված են հետևյալ կոնֆերանսներում.

- 4th International Conference of Young Scientists – “CHEMISTRY TODAY - 2014” (August 18-22, 2014, Yerevan)
- Book of Abstracts. Albany 2013: The 18th Conversation
- ԵՊՀ-ի 95 ամյակին նվիրված ՈԻԳԸ հոբելյանական գիտաժողով

Հրատարակումներ

Ատենախոսության նյութերի հիման վրա հրատարակված են 6 տպագիր աշխատանքներ, այդ թվում 4 հոդված և 2 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը

Ատենախոսությունը կազմված է ներածություն, գրականական ակնարկ, փորձարարական մաս, արդյունքները և դրանց քննարկումը, եզրակացություններ բաժիններից և ներառում է օգտագործված հապավումների և գրականության ցանկը՝ կազմված 85 անուն տպագիր հրատարակումներից:

Աշխատանքը շարադրված է 105 էջի սահմաններում, իսկ փորձարարական տվյալները ներկայացված են 63 նկարների (42-ը հիմնական տեքստում, 21-ը՝ հավելվածում) և 7 աղյուսակների տեսքով:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ՀԱՄԱՌՈՏ ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ներածությունում հիմնավորվել է թեմայի արդիականությունը, սահմանվել են հետազոտության նպատակը և խնդիրները: Ներկայացվել են

հետազոտված համակարգը, տեսական և փորձնական մեթոդները, գիտական նորույթը և գործնական նշանակությունը:

Ատենախոսության առաջին գլխում քննարկվել են ԴՆԹ-ի կառուցվածքին, կենսաբանական ֆունկցիաներին առնչվող դրույթները: Այն իր մեջ ներառում է նաև դիմեթիլսուլֆօքսիդների կառուցվածքին և կենսաբանական նշանակությանը ուղղված դրույթները: Քննարկվել է ԴՆԹ-ի և փոքր լիզանդների կապման ուսումնասիրության կարևորության և փորձնական մեթոդներին առնչվող հարցեր:

Ատենախոսության երկրորդ գլխում քննարկվել են օգտագործված նյութերի բնութագրական հատկությունները, օգտագործված մեթոդները (կլանման էլեկտրոնային, ֆլուորեսցենտային, շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրոսկոպիա, մոլեկուլային դոքինգի մեթոդ):

Ատենախոսության երրորդ գլխում բերված են փորձնական և հաշվարկային տվյալները, ինչպես նաև ստացված արդյունքների քննարկումը:

Աշխատանքի վերջում բերված են եզրակացությունները, օգտագործված հապավումները և գրականության ցանկը:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

Hoechst 33258-ԴՆԹ կոմպլեքսի կայունության ուսումնասիրությունը

Որպես մեկնարկային կետ մեր հետազոտությունների համար մենք սկսել ենք ուսումնասիրել Hoechst-ի ջրային լուծույթները ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ: DMSO-ի հետ մեր կողմից իրականացված հետազոտությունների ժամանակ իոնական ուժի արժեքը պահվել է հաստատուն և որոշվել է ԴՄՍՕ-ի ազդեցությունը ԴՆԹ- Hoechst կոմպլեքսի ջերմային կայունության վրա: ԴՄՍՕ-ի հետ իրականացված մեր հետազոտություններում կիրառվել են ինչպես կլանման էլեկտրոնային, այնպես էլ ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդները: Առաջին դեպքում ԴՆԹ-ի ջերմային հալմանը կորերը ստանալու համար հետևել ենք լուծույթի կլանմանը 260 նմ ալիքի երկարության տակ՝ ջերմաստիճանի աստիճանական բարձրացման հետ, իսկ ֆլուորեսցենց չափումների իրականացման ժամանակ հետևել ենք լուծույթի առաքմանը 461 նմ ալիքի երկարության տակ:

Նշված երկու մեթոդներով ստացված Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման կորերը բերված են նկար 1-ում:



Նկար 1. Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման կորերը առանց ԴՄՍՕ-ի և ԴՄՍՕ-ի առկայությամբ ստացված a) կլանման էլեկտրոնային, b) ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի միջոցով:

Ստացված կորերի վերլուծությունից որոշվել են Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները, որոնք ամփոփված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1. Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները՝ որոշված կլանման էլեկտրոնային և ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիաների միջոցով:

ԴՄՍՕ-ի ծավալային բաժինը, %	Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները՝ որոշված տարբեր մեթոդներով, Tm	
	Կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիա	Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիա
0	71.2	73.3
5	69.5	71.8
10	68.2	67.6
15	66.3	63.1
20	64.6	62.4

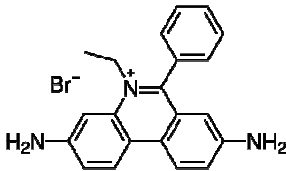
Նշված հետազոտություններում Hoechst/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունը պահպանվել է հաստատուն (0.1) և ԴՄՍՕ-ի ծավալային բաժինը փոփոխվել է 0-20 %: Ինչպես երևում է հալման կորերից և աղյուսակ 1-ի տվյալներից, ԴՄՍՕ-ի ավելացումը հանգեցնում է կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանի նվազման: Ստացված տվյալները խոսում են այն մասին, որ ԴՄՍՕ-ն նվազեցնում է կոմպլեքսի ջերմային կայունությունը: Այս երևույթը պայմանավորված է ԴՄՍՕ-ի փոխազդեցությամբ ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի հետ, որոնք հանգեցնում են ազոտային հիմքերի միջև ջրածնական կապերի քանդմանը: Ստացված արդյունքները կարող են հանդիսանալ ԴՆԹ-լիզանդ փոխազդեցության համար <<մոդելային>> համակարգ, որը ներառում է օրգանական լուծիչի չնչին քանակության առկայություն համակարգում: ԴՄՍՕ-ն

կարող է կիրառվել որպես համա-լուծիչ ջրային միջավայրում ԴՆԹ-ի լուծույթների ուսումնասիրման համար:

ԴՆԹ-էթիդումի բրոմիդի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտային բևեռացման (անիզոտրոպիայի միջոցով)

Իրականացված փորձնական աշխատանքների հաջորդ մասը ներառում է հորթի թիմուսի ԴՆԹ-էթիդումի բրոմիդի (ԷԲ) փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտային բևեռացման (անիզոտրոպիայի միջոցով):

Հայտնի է, որ ԷԲ-ն կենսաբանական լաբորատորիաներում սովորաբար օգտագործվում է նուկլեինաթթուների հայտնաբերման համար: Նրա կառուցվածքը բերված է նկար 2-ում: ԷԲ-ի մոլեկուլը ֆլուորեսցենցում է ուլտրամանուշակագույն լույսով ճառագայթվելիս և լուսարձակում է տեսանելի մասում: ԷԲ-ի ցիկլիկ կառուցվածքը ունի հիդրոֆոր բնույթ և մխրճվելով երկպարույր ԴՆԹ-ի ներքին հիդրոֆոր տիրույթ՝ առաջացնում է ամուր Վան դեր Վաալսյան կապեր ԴՆԹ-ի հիմքերի հետ: Այս մեխանիզմով կապումը կոչվում է ինտերկալացիոն, իսկ մոլեկուլները՝ ինտերկալացիոն ազենտներ:



Նկար 2. Էթիդիումի բրոմիդի կառուցվածքը

Հայտնի է նաև, որ ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի չափումների ժամանակ նմուշը ենթարկվում է ուղղահայաց լույսի ազդեցությանը: Գրգռող լույսի էլեկտրական վեկտորը զուգահեռ է ուղղահայաց (z) առանցքին: Ճառագայթման ինտենսիվությունը չափվում է բևեռացուցիչի միջով անցնելուց հետո: Երբ բևեռացուցիչը զուգահեռ է գրգռմանը, ապա ինտենսիվությունը նշանակվում է I_{VV} , ուղղահայաց դասավորության դեպքում ինտենսիվությունը նշանակվում ենք I_{VH} (V-Vertical, H-Horizontal): Ինտենսիվության այս արժեքները օգտագործվում են անիզոտրոպիայի չափման համար:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (1)$$

որտեղ G-ֆակտորը որոշվում է հետևյալ առնչությամբ՝

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2)$$

Անիզոտրոպիան չափման միավոր չունեցող մեծություն է և կախված չէ նմուշի ընդհանուր ինտենսիվությունից: Պատճառն այն է, որ

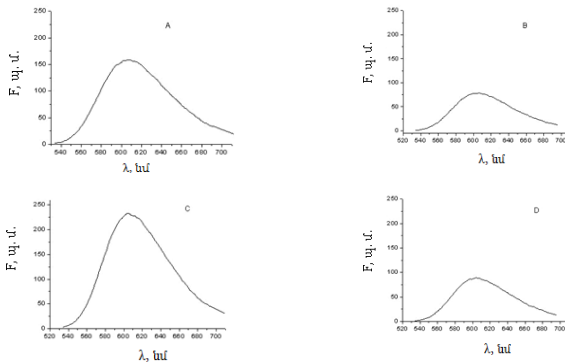
ինտենսիվությունների տարբերությունը ($I_{VV}-GI_{VH}$) նորմավորվում է ընդհանուր ինտենսիվությամբ, որը հավասար է՝ $I_T = I_{VV} + 2GI_{VH}$:

Կլանման և առաքման անցման մոմենտների կազմած անկյան միջին արժեքի և անհիզոտրոպիայի միջև կապը տրվում է հետևյալ արտահայտությամբ.

$$r = \left(\frac{2 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \quad (3)$$

Անհիզոտրոպիայի չափումներից ստացված տվյալները բնութագրում են մակրոմոլեկուլ-մակրոմոլեկուլ, մակրոմոլեկուլ-լիզանդին փոխազդեցությունները:

Մեր կողմից կատարված աշխատանքում որոշվել է ԴՆԹ-ին կապված էթիդիումի բրոմիդի անհիզոտրոպիայի արժեքը: Նկար 3-ում բերված են այդ համակարգի ֆլուորեսցենսային սպեկտրները բևեռացուցիչների տարբեր դիրքերի դեպքում:



Նկար 3. ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ կոմպլեքսի ֆլուորեսցենսային սպեկտրները բևեռացուցիչների տարբեր դիրքերի դեպքում. A. HV, B. HH, C. VV, D. VH.

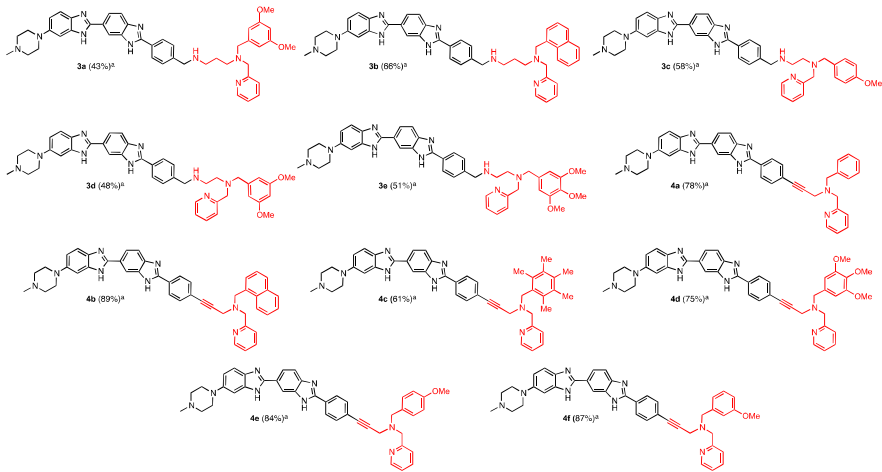
Ելնելով ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունների արժեքներից, ըստ (1) բանաձևի որոշվել է ԴՆԹ-ին կապված էթիդիումի բրոմիդի անհիզոտրոպիայի արժեքը, որը ստացվել է 0.09: Ելնելով անհիզոտրոպիայի այդ արժեքից, (3) բանաձևի միջոցով որոշվել է θ անկյան միջին արժեքը, որը հավասար է 51°: Այս հաշվարկը կատարվում է՝ ընդունելով, որ էթիդիումի բրոմիդի մոլեկուլը սիմետրիկ է z առանցքի նկատմամբ: Նշենք, որ հետազոտություններում կիրառվում են ինչպես ԴՆԹ-ին քիմիապես կապված, այնպես էլ ոչ քիմիապես կապված լիզանդներ, ինչը կախված է ուսումնասիրվող համակարգի առանձնահատկություններից:

Այսպիսով, ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ համակարգը ֆլուորեսցենսային անհիզոտրոպիայի միջոցով, որոշվել է ԴՆԹ-ին կապված

Էթիդիումի բրոմիդի անիզոտրոպիայի արժեքը: Ելնելով անիզոտրոպիայի արժեքից, որոշվել է առաքման ժամանակ անցման դիպոլ մոմենտի միջին անկյունային տեղաշարժը:

Hoechst-ի նոր ածանցյալների կառուցվածքը նրանց փոխազդեցության ուսումնասիրությունը տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ:

Կատարված հետազոտությունների հաջորդ մասը ընդգրկում է Hoechst-ի նոր ածանցյալների և տարբեր ԴՆԹ-ների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Նշված ածանցյալների ընդհանուր կառուցվածքը բերված է նկար 4-ում: Այդ ածանցյալները կարելի է բաժանել երկու խմբի՝ «ամին» և «ակլին» տիպի ածանցյալներ: Առաջին դեպքում Hoechst-ի մոլեկուլի մնացորդը պարզ կապով կապված է դիամինային շղթա պարունակող խմբին, իսկ «ակլին» տիպի ածանցյալներում այն եռակի կապով կապված է երրորդային ամինին:



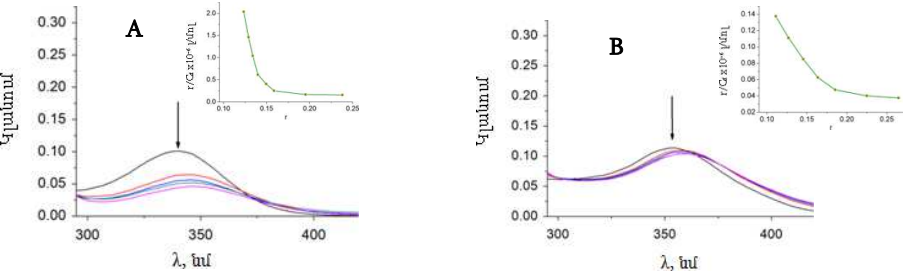
Նկար 4. Hoechst-ի նոր ածանցյալների կառուցվածքը:

Hoechst-ի նոր ածանցյալների խնամակցությունը տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ գնահատվել են բազմակողմանիորեն, և մասնավորապես խնդիր է դրված պարզելու թե ինչպես է ազդում մոլեկուլի կառուցվածքի փոփոխությունը ԴՆԹ-ի նկատմամբ խնամակցության վրա: Այդ հետազոտությունները իրականացվել են կլանման էլեկտրոնային, ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի, շրջանային դիքրոիզմի, ԴՆԹ-ի ջերմային հալման և մոլեկուլային դոքինգի (docking) մեթոդներով: Ստորև ներկայացված է այդ հետազոտությունների նկարագրությունը:

ԴՆԹ-ի հետ Hoechst-ի նոր ածանցյալների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի միջոցով

ԴՆԹ-ի և Hoechst-ի ածանցյալների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը նախնառաջ իրականացվել է կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի միջոցով: Որպես համեմատական նմուշ, իրականացվել է նաև ոչ մոդիֆիկացված Hoechst-ի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը: Կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի չափումներում օգտագործվել է ինչպես հորթի թիմուսի ԴՆԹ, այնպես էլ պոլի[d(U-Թ)]: Hoechst-ի ածանցյալների կլանման սպեկտրները գրանցվել են ԴՆԹ-ի աստիճանական ավելացման հետ, որը հնարավորություն է տալիս քանակապես նկարագրելու նրանց փոխազդեցությունը: Նշված ածանցյալների կապման հաստատունները որոշվել են ելնելով տիտրման կորերից:

Նշված միացություններից 3a-ի և 4b-ի կլանման սպեկտրները հորթի թիմուսի լուծույթով տիտրման ընթացքում բերված են նկար 5-ում: Hoechst-ի ածանցյալների լուծույթների տիտրման տվյալները ցույց են տալիս, որ «ամին» տիպի ածանցյալները հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ով տիտրման ժամանակ նկարագրվում են ավելի խորը հիպոքրոմիկ էֆեկտով (300-400 նմ տիրույթում մինչև 65 %), քան նրանց «ալկին» անալոգները: Սա հատկապես ընգծված արտահայտվել է 3a-ի համար, որը ցուցաբերում է խորը հիպոքրոմիկ էֆեկտ, ինչպես նաև «կարմիր շեղում» տիտրման ընթացքում: Մինչդեռ «ալկին» անալոգները նկարագրվում են ավելի փոքր հիպոքրոմիկ էֆեկտով, ինչպես ցույց է տրված նկար 5 B-ում 4b ածանցյալի օրինակով (8 %):



Նկար 5. 3a-ի (A) և 4b-ի (B) կլանման սպեկտրները հորթի թիմուսի լուծույթով տիտրման ընթացքում: Մլաքները ցույց են տալիս կլանման նվազումը 341 և 355 նմ ալիքի երկարությունների տակ (3a-ի և 4b-ի համար, համապատասխանաբար): Ներդրված նկարները ներկայացնում են Սկատչարդի կորերը, որոնց հիման վրա որոշվել են կապման հաստատունները:

Աղյուսակ 2-ում բերված են կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով որոշված բոլոր հաստատունների արժեքները: Իրականացվել են նաև չափումներ ջերմային հալման մեթոդով՝ Hoechst 33258-ի նշված ածանցյալների և 20 ազոտային հիմք պարունակող օլիգոնուկլեոտիդի միջև:

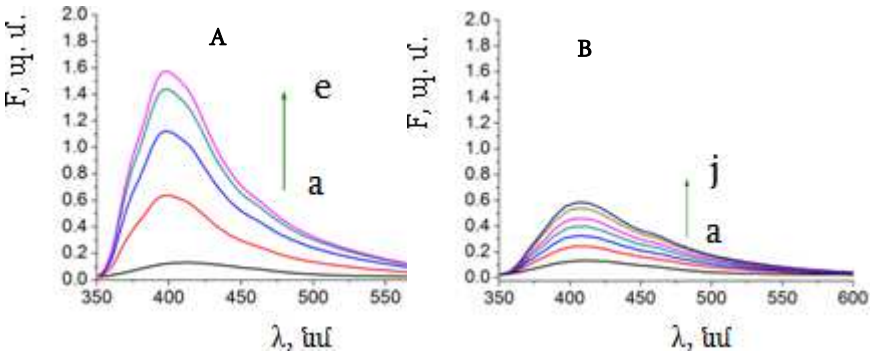
Աղյուսակ 2. Hoechst-ի ածանցյալների և հթ-ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրման արդյունքները, որոնք ստացվել են կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով:

Միացություն	λ_{max} ազատ լիզանդ (նմ)	λ_{max} կապված լիզանդ (նմ)	ΔE (սմ ⁻¹)	% հիպոքրոմիզմ (ալիքի երկարություն, նմ)	Ջազատ (Մ ⁻¹ սմ ⁻¹)	Ջկապ. (Մ ⁻¹ սմ ⁻¹)	$K_a \times 10^{-6}$, Մ ⁻¹
3a	341	352	916	65 (341)	25,500	8,920	3.24(±0.3)
3b	344	352	661	62 (344)	24,500	9,310	2.40(±0.2)
3c	340	349	758	45 (340)	19,500	10,730	1.00(±0.1)
3d	338	346	684	55 (338)	21,250	9,560	1.20(±0.1)
3e	343	348	419	60 (343)	25,000	10,000	1.60(±0.1)
4a	355	358	236	8 (355)	28,750	26,450	0.15(±0.02)
4b	352	358	476	17 (352)	25,750	21,370	0.75(±0.1)
4c	350	354	323	14 (350)	22,450	19,310	0.65(±0.05)
4d	355	360	391	12 (355)	18,500	16,280	0.54(±0.03)
4e	347	354	570	10 (347)	22,570	20,540	0.35(±0.03)
4f	349	357	640	9(349)	20,600	18,950	0.28(±0.01)

Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի չափումները

Ֆլուորեսցենտային մեթոդով չափումները իրականացվել են նկարագրելու համար 3a միացության կապումը տարբեր հաջորդականություններ պարունակող ԴՆԹ-ների հետ: 3a միացության ընտրությունը պայմանավորված է հթ-ԴՆԹ-ի և պոլի[d(U-Թ)]-ի հետ նրա կապման մեծ հաստատունով: Այդ նպատակով 3a-ի լուծույթը տիտրվել է հինգ տարբեր օլիգոնուկլեոտիդների լուծույթներով, որոնք ունեն հետևյալ հաջորդականությունը. 5'-d(CGCGXCGCGTTTTCGCGXCGCG)-3', որտեղ X-ը ներկայացնում է նուկլեիդաթթուների հաջորդականությունը, որը փոփոխվել է և իրենից ներկայացնում են հետևյալ հաջորդականությունները. X=ATAT, TAAT,

TATA, TTAA և AATT: Հիմնվելով ֆլուորեսցենտային չափումների վրա, մենք որոշել ենք 3a-ի համար ուժեղ և թույլ կապման տեղերը: Նկար 6-ը ներկայացնում է 3a-ի ֆլուորեսցենց տիտրման կորերը ԴՆԹ-ի նշված շղթաներով, որտեղ X=AATT (ուժեղ կապման կենտրոն) և X=TATA (թույլ կապման կենտրոն): Առավելագույն աճ ֆլուորեսցենտային ինտենսիվության մեջ ի հայտ է եկել AATT հաջորդականության համար, մինչդեռ ամենացածր աճը դիտվել է TATA հաջորդականության համար: Բոլոր դեպքերում, այնուամենայնիվ, ֆլուորեսցենտային ինտենսիվության աճի հագեցումը դիտվել է լիզանդ/ԴՆԹ-ի 1:1 հարաբերությամբ դեպքում, ինչը փաստում է այն մասին, որ լիզանդը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է մոնոմեր ձևով:



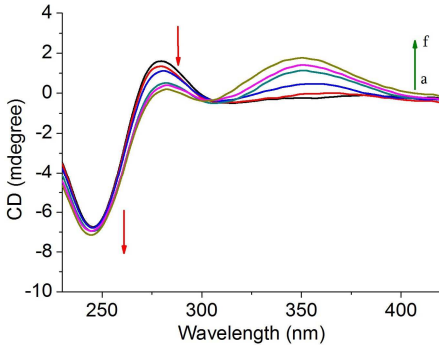
Նկար 6. **3a** միացության ֆլուորեսցենտային տիտրման կորերը հետևյալ օլիգոնուկլեինաթթուներով. **A.** X=AATT a-e -[ԴՆԹ/լիզանդ]=0-1.08, **B.** X=TATA, a-j-[ԴՆԹ/լիզանդ]=0-1.08.

Ի լրումն, ֆլուորեսցենտային չափումները ի հայտ են բերում 3a միացության խնամակցությունը կախված ազոտային հիմքերի հաջորդականությունից (TATA<TTAA<TAAT<ATAT<AATT), որը համապատասխանում է Hoechst 33258-ի ընտրողական հաջորդականությանը ԴՆԹ-ի նկատմամբ: Հիմնվելով ֆլուորեսցենտային տիտրման արդյունքների վրա, որոշվել են 3a միացության կապման հաստատունները նշված հինգ տարբեր օլիգոնուկլեոտիդների հետ:

Շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրոսկոպիական չափումները

Շրջանային դիքրոիզմի (ՇԴ) չափումները իրականացվել են 3a միացության և հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի միջև: Ոչ լիզանդը, ոչ հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ն չունեն ՇԴ ազդանշան 300 նմ տիրույթից մեծ ալիքային երկարությունների դեպքում: Հետևելով հարուցված շրջանային դիքրոիզմի ազդանշանին, որոշվել են 3a միացության կապման եղանակը և ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության հագեցման

հարաբերությունը: 3a միացության ավելացումը հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի լուծույթին բերում է շրջանային դիքրոիզմի (ՇԴ) ազդանշանի հարուցմանը 300-400 նմ ալիքային երկարության տիրույթում, ինչը փաստում է 3a -ի կապումը ԴՆԹ-ի փոքր ակոսին: Հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի տիրման ՇԴ կորերը 3a միացությամբ բերված են նկար 7-ում:



Նկար 7. ԴՆԹ-ի շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրները առանց 3a-ի ($r=0$, $[\Delta\epsilon_{\text{ԴՆԹ}}]=80$ մկՄ) և 3a-ի տարբեր քանակությունների առկայության դեպքում, երբ լիզանդ/ԴՆԹ հարաբերությունը կազմել է. a-f- 0, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15: Սլաքները մատնանշում են ԴՆԹ-ի ՇԴ ազդանշանի փոփոխությունները:

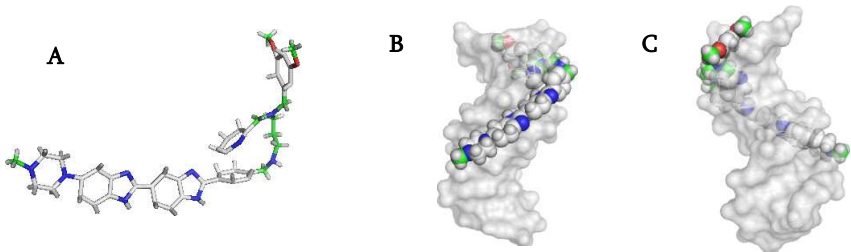
Հատկանշական է, որ 3a-ի հարուցված ՇԴ ազդանշանի դիրքը համընկնում է նրա կլանման պիկի դիրքի հետ, ինչը փաստում է այն մասին, որ միևնույն քրոմոֆորն է պատասխանատու հարուցված ՇԴ ազդանշանի համար:

Հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի ՇԴ ազդանշանները նվազում են 245 և 280 նմ ալիքի երկարությունների տակ և $r=0.15$ հարաբերությունից բարձր արժեքների դեպքում 3a միացության հետագա ավելացումը այլևս չի բերում որևէ փոփոխության: Այսպիսով, ՇԴ սպեկտրոսկոպիայի չափումները պարզում են 3a միացության՝ ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում կապումը և հաստատում են կապման ժամանակ լիզանդի և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերի կոնցենտրացիաների հարաբերությունը:

Տեսական մոլեկուլային մոդելավորման հետազոտությունները. Մոլեկուլային դոքինգ

3a-ի կապումը ԴՆԹ-ին ավելի մանրակրկիտ նկարագրելու և բացահայտելու համար ամենահավանական կոնֆորմացիաները, որոնցով միանում է 3a-ն ԴՆԹ-ին, մենք իրականացրել ենք նաև մոլեկուլային դոքինգի տեսական չափումներ: ԴՆԹ-ի համար որպես կրկնակի պարույր ընտրվել է հետևյալ հաջորդականությունը. 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' (այսպես կոչված

Դիկերսոնի հաջորդականություն): Դոքինգի չափումները իրականացվել են AutoDock Vina համակարգչային ծրագրի միջոցով: Մոլեկուլային դոքինգի արդյունքները ներկայացված են նկար 8-ում:



Նկար 8. 3a միացության մոլեկուլային մոդելները 5'-d(CGCGAATTCGCG)-3' հաջորդականության վրա դոքինգի արդյունքում: A. 3a միացության կոնֆորմացիան, որի դեպքում այն ունի առավելագույն խնամակցություն ԴՆԹ-ի նկատմամբ, Դոքինգի արդյունքները՝ B. ԴՆԹ-ի փոքր ակոսից, C. ԴՆԹ-ի մեծ ակոսից դիտելիս: Պատկերները ստացվել են դոքինգից ստացված արդյունքների հիման վրա՝ օգտագործելով PyMOL համակարգչային ծրագիրը:

3a միացության համար դոքինգի արդյունքները ի հայտ են բերել ինը հնարավոր կոնֆորմացիաներ, որոնց համար խնամակցությունը ընկած է -54.8-ից -47.88 կՋ.մոլ⁻¹: Դոքինգի արդյունքները ի հայտ են բերում ջրածնական կապի միջոցով փոխազդեցության հնարավորություն բենզիմիդազոլային օղակի N-H խմբի և ԴՆԹ-ի ադենին և թիմին ազոտային հիմքերի միջև, ԴՆԹ-ի փոքր ակոսի հատակում, որը բնութագրական է Hoechst-ի ընտանիքին պատկանող բենզիմիդազոլ պարունակող լիգանդների համար: Ավելին, դոքինգի արդյունքները ցույց են տալիս ջրածնական կապերի առաջացումը պիրիդինային օղակի և գուանին ազոտային հիմքի միջև, որը մեծացնում է գուանին հիմքի նկատմամբ խնամակցությունը 3a միացության համար (ինչպես նաև նրա հոմոլոգների համար):

Եզրակացություններ

1. Էլեկտրոնային կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով ցույց է տրվել, որ ԴՄՍՕ-ն նվազեցնում է Hoechst-ԴՆԹ կոմպլեքսի ջերմային կայունությունը: Ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի մեթոդով որոշվել է ԴՆԹ-ի հետ կապված էթիդիումի բրոմիդի մոլեկուլի անկյունային տեղաշարժը:
2. Կլանման էլեկտրոնային, ֆլուորեսցենտային, շրջանային դիքորիզմի սպեկտրոսկոպիաների միջոցով բազմակողմանիորեն նկարագրվել են

Hoechst-ի նորագույն ածանցյալների խնամակցությունները տարբեր ԴՆԹ-ների նկատմամբ: Կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի արդյունքները ցույց են տվել, որ «ամին» տիպի ածանցյալները նկարագրվում են ավելի բարձր խնամակցությամբ հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի և պոլի[d(A-T)]-ի նկատմամբ, քան նրանց «ալկին» ածանցյալները, որը պայմանավորված է մոլեկուլի տարբեր հատվածների շարժունակությամբ և էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններով:

3. Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիական չափումները ի հայտ են բերում 3a միացության (որպես ԴՆԹ-ի նկատմամբ ամենամեծ խնամակցություն ունեցող ածանցյալի) խնամակցությունը՝ կախված ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտիդների հաջորդականությունից: Արդյունքները ցույց են տալիս, որ 3a-ի խնամակցությունը, կախված նուկլեոտիդների հաջորդականությունից, աճում է հետևյալ հաջորդականությամբ. TATA<TTAA<TAAT<ATAT<AATT:
4. Hoechst-ի ածանցյալների և 20 ազոտային հիմք պարունակող օլիգոնուկլեոտիդների հետ ջերմային հալման հետազոտությունները հաստատում են կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի միջոցով գնահատված խնամակցությունները: Շրջանային դիքրոիզմի չափումները ցույց են տալիս 3a-ի կապումը ՀԹ ԴՆԹ-ի փոքր ակոտում, որը դրսևորվում է հարուցված շրջանային դիքրոիզմի ազդանշանի առաջացմամբ 300-400 նմ տիրույթում: Մոլեկուլային դոփինգի չափումները ի հայտ են բերում 3a միացության և ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտիդի միջև հնարավոր ջրածնական կապերը: Ջրածնական կապերի առաջացմանը մասնակցում են 3a մոլեկուլի ազոտի ատոմները և ԴՆԹ-ի ազոտային հիմքերը:

Ստենախոսության հիմնական արդյունքները հրատարակվել են հետևյալ գիտական աշխատանքներում.

1. K. Amirbekyan, N. Duchemin, E. Benedetti, R. Joseph, A. Colon, S. A. Markarian, L. Bethge, S. Vonhoff, S. Klussmann, J. Cossy, J.-J. Vasseur, S. Arseniyadis and M. Smietana, Design, Synthesis, and Binding Affinity Evaluation of Hoechst 33258 Derivatives for the Development of Sequence-Specific DNA-Based Asymmetric Catalysts, ACS Catalysis, 2016, 6, pp. 3096-3105.
2. K. Yu. Amirbekyan, Study of interaction of Hoechst 33258 and DNA in water-dmsol mixed solvents, Proceedings of the Yerevan State University, 2016, № 1, p. 10-13.
3. Amirbekyan, K.Y., A. P. Antonyan, P. O. Vardevanyan, and Sh. A. Markarian, Molecular interactions between benzimide trichloride (Hoechst 33258) and

DNA in dimethyl sulfoxide aqueous solutions, according to spectroscopy data. Russian Journal of Physical Chemistry A, 2013. 87(12): p. 2027-2029.

4. Ամիրբեկյան Կ., Պետրոսյան Հ., ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի միջոցով, ԵՊՀ ՈԻԳԸ գիտական հոդվածների ժողովածու, ԵՊՀ հիմնադրման 95-ամյակին նվիրված հոբելյանական գիտական նստաշրջանի նյութեր, 1.1 (4), բնական գիտություններ (կենսաբանություն և քիմիա), 126-130, Երևան, ԵՊՀ հրատարակչություն, 2015.
5. Vardevanyan, P.O., Antonyan A.P., Amirbekyan K.Yu., Markarian Sh. A., The investigation of Hoechst 33258 interaction with DNA in aqueous solutions of dimethylsulfoxide. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2013. 31: p. 59-60.
6. Amirbekyan K. Yu., Study of the interaction between DNA and Ethidium Bromide by fluorescence anisotropy, 4th International Conference of Young Scientists – “CHEMISTRY TODAY - 2014”, Book of abstracts, Yerevan, August 18-22, 2014, Armenia, pp. 101-102.

ФИЗИКОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
НОЕCHST 33258 И ЕГО НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ С ДНК

РЕЗЮМЕ

Исследование взаимодействия разных лигандов с ДНК продолжает оставаться в центре внимания многих научных лабораторий. Эти исследования важны и актуальны в современной биохимии и генетике, так как они помогают детально характеризовать и контролировать многие биохимические и биологические процессы.

В диссертационной работе исследовано взаимодействие ДНК и известного интеркалятора бромистого этидия, а также лиганда Ноеchst 33258, связывающихся в малой бороздке ДНК. Также было изучено взаимодействие разных производных Ноеchst 33258 с ДНК с целью выявления влияния этих лигандов на структурные и функциональные свойства ДНК. Для решения этих задач были использованы следующие методы: электронная абсорбционная спектроскопия, метод термической денатурации, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия циркулярного дихроизма и молекулярного докинга. Научная новизна диссертации состоит в комплексном исследовании взаимодействия бромистого этидия, Ноеchst 33258-а и его новых производных с ДНК. Впервые были представлены разные производные Ноеchst 33258-а и изучены их взаимодействия с ДНК.

Основные результаты и научная новизна заключаются в следующем. Приведены результаты исследования взаимодействия Ноеchst 33258 с ДНК тимуса телёнка без и в присутствии диметилсульфоксида. Выявлено, что диметилсульфоксид снижает тепловую устойчивость комплекса Ноеchst 33258-ДНК. Были изучены характеристики флуоресцентной поляризации (анизотропии) бромистого этидия в присутствии ДНК. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований взаимодействия лиганд-ДНК методом флуоресцентной поляризации (анизотропии).

Исследовано взаимодействие новых производных Ноеchst 33258-а с разными ДНК с помощью спектроскопических и теоретических методов. Полученные результаты показывают, что производные типа «амин», в

которых связь между остатком Hoechst 33258-а и второй частью молекулы (содержащий третичный амин) является простая карбогидратная цепь, проявляют более высокое сродство к ДНК тимуса теленка и поли[d(A-T)₂], чем производные типа «алкин» (в которых эта связь третичная). Это можно объяснить подвижными свойствами частей молекул типа «амин» и более сильными электростатическими взаимодействиями, сравнивая с производными типа «алкин». Исследования методом тепловой денатурации показывают, что комплексы ДНК с производными типа «амин» более устойчивы, чем комплексы с производными «алкин». Эти результаты подтверждают высокое сродство производных «амин» по сравнению их «алкин» аналогов. Измерения методом флуоресценции выявляют, что сродство соединения За к ДНК зависимо от последовательностей азотистыми основаниями увеличивается согласно следующему ряду: ТАТА<ТТАА<ТААТ<АТАТ<ААТТ. Также было показано образование 1:1 комплекса За с использованными олигонуклеотидами.

Исследования методом циркулярного дихроизма показывают, что За соединяется в малой бороздке ДНК, которое проявляется позитивным индукционным циркулярным дихроизмом в интервале 300-400 нм длины волн. Также исследования циркулярным дихроизмом показывают, что комплекс между За и ДНК образуется при концентрационном соотношении За и ДНК тимуса теленка 0.15, которое находится в согласии с результатами электронной абсорбционной спектроскопии.

Теоретические изучения методом молекулярного докинга выявляют возможные водородные связи между За и азотистыми основаниями ДНК, рассчитаны длины водородных связей. Показано, что кроме водородных связей, которые характерны Hoechst 33258-а, возможно образование водородной связи между пиридинным азотным атомом За и аминной группы гуанина.

Диссертационная работа содержит обобщающие выводы, полученные в ходе проведенных исследований и предложения относительно решения ряда биохимических проблем.

Благодаря решению проблем, выявленных в диссертационном исследовании, возможно в ближайшей перспективе развить новые подходы для решения многих проблем, касающихся изучения взаимодействия лигандов и ДНК.

AMIRBEKYAN KAREN YURIK

**PHYSICOCHEMICAL STUDY OF THE INTERACTION OF HOECHST 33258
AND ITS NEW DERIVATIVES WITH DNA**

RESUME

The study of the interaction between ligands and DNA remains the focus of many research groups. These studies are of crucial importance nowadays in biochemistry and genetics as they allow describing and controlling many biological and biochemical processes.

The main goal of the doctoral thesis is the study of the interactions of intercalator ethidium bromide, minor groove binder Hoechst 33258 with DNA. Also it was investigated the binding of new Hoechst 33258 derivatives with different DNAs for the purpose to reveal the effect of these ligands on structural and functional properties of DNA. To achieve above mentioned goals different spectroscopic and theoretic techniques were employed. These include UV-vis absorption spectroscopy, thermal melting studies, fluorescence spectroscopy conjugated with fluorescence polarization (anisotropy), circular dichroism spectroscopy and molecular docking studies,

Studies of the interaction of Hoechst 33258 with calf thymus DNA in the presence of dimethylsulfoxide show that DMSO reduced the melting temperature of the Hoechst 33258-DNA complex. Studies with ethidium bromide allow to determine the anisotropy of ethidium bromide bound to DNA and to describe the orientation of the ligand upon binding with DNA.

The scientific novelty of the doctoral thesis is the study of the interaction of ethidium bromide and DNA by fluorescence polarization (anisotropy) and the study of Hoechst 33258 with DNA in the presence of dimethylsulfoxide. First time was studied the interaction of new derivatives of Hoechst 33258 with different DNAs. The results show that "amine" type of derivatives possess higher affinity toward DNA than their alkyne analogues. Based on these studies the strong binders were determined. It was shown that amine type of Hoechst 33258 derivatives possess expressed high affinity toward calf thymus DNA and poly[d(A-T)₂] than their alkyne derivatives.

The main results and novelty of the doctoral thesis are given below. The results of the interaction of Hoechst and calf thymus DNA in absence and in the presence of dimethylsulfoxide are given in the thesis. It was shown that

dimethylsulfoxide decreases the thermal stability of the Hoechst-DNA complex. It was studied the characteristics of the fluorescence polarization of ethidium bromide in the presence of calf thymus DNA. The obtained results can be further developed for the study of ligand-DNA interactions by fluorescence polarization. The interaction of new Hoechst 33258 derivatives with different DNAs was studied by different methods such as UV-vis absorption, fluorescence, circular dichroism spectroscopy and molecular docking. The results show that "amine" type derivatives in which the linker between the Hoechst residue and tertiary amine is a simple carbohydrate chain, expressed higher affinity toward DNA than their "alkyne" analogues where that linker is tertiary bound. This result can be explained by the high flexibility of the different moieties of "amine" derivatives and the strong electrostatic interactions with DNA (compared with their "alkyne" analogues).

Fluorescence studies reveal the sequence specificity of 3a toward DNA. It was revealed that affinity of 3a toward different DNAs increases with the following direction: TATA<TTAA<TAAT<ATAT<AATT. Also, it was shown that 3a forms 1:1 complex with the oligonucleotides studied.

Melting studies with 20-mer oligonucleotide and Hoechst derivatives reveal that "amine" type of derivatives increase the stability of DNA strongly compared with their "alkyne" analogues.

Circular dichroism measurements show that the addition of 3a to calf thymus DNA induces positive circular dichroism in the region between 300-400 nm, which is proof of minor groove binding. Also circular dichroism measurements reveal that the binding saturation between 3a and calf thymus DNA was observed at ligand/DNA ratio equal to 0.15 which is in good agreement with UV-vis absorption results.

Molecular docking studies reveal the binding of 3a in the minor groove of DNA and unveil the hydrogen bonds between 3a and DNA bases. It is noteworthy, that besides hydrogen bonds characteristic for Hoechst 33258, molecular docking studies show the possibility of hydrogen bond formation between pyridine nitrogen atom of 3a and amino group of guanine base.

The doctoral thesis contains summarizing conclusions, obtained upon experiments that were carried out and suggestions to solve many biochemical tasks. Owing to the solving of different tasks discussed in the thesis, it is possible to develop new approaches and solutions for the study of ligand-DNA interactions.

