

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ ՆԱՐԱ ՀՐԱՉԻԿԻ

ԴԼԹ-ՀԱՏԿՈՐՈՇԻՉ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐ ՄԵԹԻԼԵՆԱՅԻՆ ԿԱՊՈՒՅՏԻ և HOECHST  
33258-Ի ՄԻԱՑՈՒՄԸ ՇԻՃՈՒԿԱՅԻՆ ԱԼԲՈՒՄԻՆԻ ՀԵՏ

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

ԵՐԵՎԱՆ 2022

---

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПЕТРОСЯН НАРА ГРАЧИКОВНА

СВЯЗЫВАНИЕ ДНК-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО  
И HOECHST 33258 С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

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

ЕРЕВАН 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ.  
Վարդանյան Պ.Հ.

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Ֆիզմաթ.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր  
Ե.Բ.Դալյան  
Կենս.գիտ.թեկնածու, դոցենտ  
Ս.Գ.Տիրացույան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Լ.Օրբելու անվ.  
ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022թ. նոյեմբերի 25-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-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 2022թ. հոկտեմբերի 14-ին:

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

Մ.Ա.Փարսադանյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор биологических наук, проф.  
П.О. Вардеванян

Официальные оппоненты:

доктор физ.-мат. наук, профессор Е.Б. Далян  
кандидат биол. наук, доцент С.Г. Тирацунян

Ведущая организация:

Институт физиологии им. Л.Орбели НАН РА

Защита диссертации состоится 25-го ноября 2022г. 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 14-го октября 2022г.

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

М.А.Парсаданян

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Интерес к изучению процессов, протекающих с участием макромолекул, особенно белков, обусловлен не только их фундаментальными, но и прикладными значениями, поскольку позволяют выявить и регулировать ключевые этапы этих процессов. Существенную роль во многих процессах, происходящих в организме теплокровных, играет белок крови - альбумин, пространственная структура и функциональные свойства которого важны для реализации того или иного процесса. Альбумин является основным белком крови, одна из функций которого состоит в депонировании и переносе широкого спектра низко- или высокомолекулярных эндогенных и экзогенных соединений. Так, альбумин может связывать и переносить не только низкомолекулярные соединения – лиганды, но и высокомолекулярные полимеры, в том числе, олигонуклеотиды или нуклеиновые кислоты. Однако, транспортная функция альбумина не является единственной: этот белок обладает также катализирующими свойствами и может участвовать в нескольких типах химических реакций (Fasano M., et al, 2005).

Альбумин в сыворотке крови подвергается некоторым химическим модификациям, например, гликированию и A'-гомоцистеинилированию, причем содержание модифицированных форм белка существенно увеличивается с возрастом, а также при развитии ряда патологических процессов.

С альбумином способны связываться многие лекарственные препараты и токсические вещества. При этом, альбумин в большинстве случаев может определить их фармакологическое и токсикологическое влияние на организм, осуществляя перенос этих веществ к мишеням или к местам их конечной биотрансформации (Ghuman J., et al, 2005; Fischer K., et al, 2014).

С этой точки зрения, изучение взаимодействия различных, в том числе – ДНК-специфических лигандов с альбумином является актуальным вопросом современной молекулярной биофизики в связи с необходимостью понимания механизмов конформационных изменений макромолекулы, а также для создания новых, более эффективных и менее токсичных биологически активных препаратов. Среди ДНК-специфических лигандов практическое применение получили интеркалирующий лиганд метиленовый синий (МС) и желобковое соединение Hoechst 33258 (H33258). Взаимодействие этих лигандов с нуклеиновыми кислотами изучено достаточно подробно, в то время как их связыванию с альбумином посвящены единичные работы, несмотря на то, что при транспортировке этих лигандов, имеющих также лекарственное значение, активную роль может играть альбумин крови.

**Цель диссертационной работы.** Целью данной работы явилось исследование взаимодействия ДНК-специфических лигандов - интеркалятора метиленового синего (МС) и желобково связывающего соединения Hoechst 33258 с альбумином, для выявления особенностей связывания этих лигандов с белком, а также выяснения их влияния на структуру протеина.

**Задачи диссертационной работы.**

Для осуществления указанной цели были поставлены следующие задачи:

- Исследование связывания МС с альбумином методами УФ-денатурации, абсорбционной, дифференциальной, а также флуоресцентной спектроскопии;
- Исследование связывания H33258 с альбумином указанными методами;
- Определение особенностей влияния МС и H33258 на структуру белка;

- Изучение структурных перестроек комплексов МС и Н33258 с альбумином.
- Сравнительное исследование комплексообразования МС с альбумином и ДНК;
- Сравнительное исследование комплексообразования Н33258 с альбумином и ДНК.

**На защиту выносятся:**

- Результаты исследований по взаимодействию МС с альбумином;
- Результаты исследований по взаимодействию Н33258 с альбумином;
- Результаты сравнительных исследований по взаимодействию МС и Н33258 с альбумином и ДНК;
- Результаты термодинамических исследований по взаимодействию МС и Н33258 с альбумином.

**Научная новизна и практическая значимость диссертационной работы.**

Полученные в работе экспериментальные данные представляют новизну, выявляя некоторые особенности взаимодействия лиганда-интеркалятора МС и желобкового соединения, Н33258 с альбуминов сыворотки крови. Получены данные, которые выявили, что МС связывается с белком и стабилизирует его пространственную структуру, при этом, имеет место увеличение компактности глобулярной структуры (folding). Н33258 также, как и МС, связывается с белком, однако, в противоположность интеркалятору, приводит к определенной дестабилизации пространственной структуры протеина, вследствие чего белок под воздействием тепла разворачивается при более низких температурах.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что экспериментальные данные, полученные впервые, выявляют разнонаправленное действие различных ДНК-специфических лигандов на третичную структуру альбумина. Фактически, эти данные могут стать фундаментом для дальнейших исследований по взаимодействию ДНК-специфических лигандов или лекарственных препаратов с альбумином крови, а также для конструирования и скрининга новых лекарств, обладающих большей эффективностью и меньшей токсичностью.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры биофизики ЕГУ и на научной конференции: V Intern. Conf. of Biotech. and Health, (29-31 Октября, Ереван, Армения, 2020).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 научных статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах и 1 тезис в материалах международной конференции.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения и трех глав, изложена на 120 страницах. Диссертация содержит 22 рисунков, 6 таблиц и список цитируемой литературы из 155 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 альбумина, по механизму его конформационных перестроек, по денатурации, а также по механизму связывания лигандов с ним.

Во второй главе приведены материалы и методы исследования.

В работе использовались бычий сывороточный альбумин (БСА), сывороточный альбумин человека (САЧ), ДНК тимуса теленка, метиленовый синий (МС), Hoechst 33258 (H33258) ("Sigma", USA), физиологический раствор, бидистиллированная вода. Концентрации белка, ДНК и лигандов определялись спектрофотометрически, с использованием следующих коэффициентов экстинкции:  $\epsilon_{664}=76000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для МС,  $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для H33258,  $\epsilon_{280}=43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для БСА,  $\epsilon_{280}=35700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для САЧ,  $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для ДНК тимуса теленка.

Спектрофотометрические измерения растворов макромолекул (белка и ДНК) и их комплексов с указанными лигандами проводилось на двухлучевых спектрофотометрах PVE Unicam-SP8-100 (Англия) и PerkinElmer UV/VIS Lambda 365 (США). Денатурация образцов проводилась на спектрофотометре PVE Unicam-SP8-100 (Англия). Нагрев термостатируемых ячеек осуществлялся с помощью программного устройства SP 876 Series 2. Изменения поглощения комплексов регистрировались при длине волны поглощения ДНК  $\lambda=260 \text{ nm}$  и длине волны поглощения альбумина  $\lambda=280 \text{ nm}$ . Эти данные выводились на монитор ПК с помощью программного обеспечения в среде LabVIEW. Взаимодействие МС и H33258 с ДНК и альбумином методом абсорбционной спектроскопии исследовалось на спектрофотометре PerkinElmer UV/VIS Lambda 365. Данные по поглощению были анализированы программным обеспечением Microsoft Excel 2010 и получены спектры поглощения (СП) и дифференциальные спектры поглощения (ДС) в интервале изменения  $500 \leq \lambda \leq 750 \text{ nm}$  при МС и  $300 \leq \lambda \leq 450 \text{ nm}$  – при H33258.

Спектры флуоресценции лигандов и их комплексов с альбумином получены на спектрофлуориметрах Cary Eclipse (Australia) и F96Pro Fluorescence Spectrophotometer (China). Возбуждение растворов комплексов МС с альбумином проводилось при  $620 \text{ nm}$ , спектры флуоресценции регистрировались в интервале  $600 \leq \lambda \leq 750 \text{ nm}$ , в случае H33258 с альбумином возбуждение осуществлялось при  $343 \text{ nm}$ , спектры спектры флуоресценции регистрировались в интервале  $400 \leq \lambda \leq 600 \text{ nm}$ .

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

**Термическая денатурация альбумина и его комплексов с тиозиновым красителем метиленовым синим.** Для понимания влияния МС на структуру альбумина проведено исследование методом УФ-денатурации. На рис. 1. приведены нормализованные кривые денатурации МС с альбумином в отсутствие и присутствии лиганда в условиях различных концентрационных соотношениях -  $g$  ( $g=[\text{МС}]/[\text{альбумин}]$  составляла 0; 0,10; 0,20 и 1,00). Из приведенного рисунка видно, что кривые денатурации комплексов сдвинуты в сторону более высоких температур, относительно кривой денатурации белка. Сдвиг кривых денатурации альбумина в присутствии тиозинового красителя МС в сторону больших температур может быть обусловлен образованием комплексов и стабилизацией структуры белка лигандом.

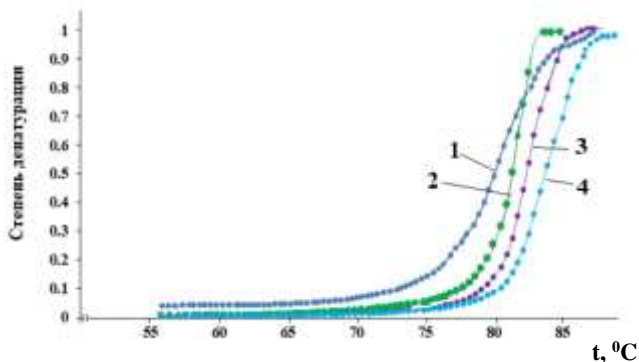


Рис. 1. Кривые денатурации альбумина и его комплексов с МС при соотношениях  $r = \text{МС/альбумин}$ : 1) 0; 2) 0,1; 3) 0,2 и 4) 1,0.

Как видно из приведенного рисунка, эти кривые гладкие, что указывает на однофазный переход белка и его комплексов с МС из нативного в денатурированное состояние. Этот факт указывает на то, что альбумин крови, несмотря на то, что имеет доменную структуру, при термической денатурации себя ведет как гомополимер. Это является результатом гомологичности по структуре трех доменов и субдоменов этого белка, что, фактически, не искажается при связывании с МС. В результате этого кривые комплексов также отражают однофазный характер денатурации. Из кривых денатурации также выявляется, что, вследствие образования комплексов возрастает стабильность нативной структуры белка, в то время как температурный интервал денатурации уменьшен, что может быть результатом конформационного изменения, инициированного метиленовым синим. Из кривых определены значения  $T_m$  и  $\delta T_m$  ( $\delta T_m = T_m - T_0$ , где  $T_m$  и  $T_0$  температуры денатурации альбумин-МС комплексов и альбумина соответственно). Из рисунка видно, что  $T_m$  возрастает примерно на 5 градусов. Фактически, наибольший эффект изменений температуры денатурации имеет место при соотношении лиганд:альбумин  $\approx 1:1$ , что отражает стехиометрию взаимодействия. Это указывает на то, что, в молекуле белка существует один центр адсорбции для этого лиганда, который, при этом, нельзя считать специфическим.

Таким образом, на основании полученных данных можно полагать, что предпочтительным для связывания МС становится относительно гидрофильный Сайт II, несмотря на то, что МС является относительно гидрофобным лигандом и казалось бы, что более гидрофобный Сайт I должен быть предпочтительным центром связывания для этого лиганда. По всей вероятности, основную роль при связывании МС с альбумином играет неспецифическое электростатическое взаимодействие с относительно гидрофильным Сайтом I (расположенный в субдоме IIА) (Petitpas I., et al. 2001; Simard, J.R., et al. 2006). Следовательно, можно полагать, что МС, будучи специфически связывающимся несколькими способами с ДНК лигандом, может взаимодействовать также с белками, не проявляя какой-либо специфичности к протенину.

**Термическая денатурация альбумина и его комплексов с бисбензимидазильным соединением Hoechst 33258.** Кривые денатурации комплексов Н33258-альбумин при различных концентрационных соотношениях приведены на рис. 2 (эти кривые также нормализованы). Как видно из приведенного рисунка, кривые денатурации комплексов, при низких соотношениях (кривые 2 и 3) незначительно сдвинуты относительно кривой денатурации белка (кривая 1) в сторону более низких температур. При увеличении концентрации лиганда эти кривые отклоняются

значительно в сторону низких температур (кривые 4 и 5), что указывает на то, что H33258, связываясь с белком, вызывает разворачивание его структуры. Было показано, что связывание H33258 с БСА приводит к конформационному изменению белка, обусловленной частичной потерей  $\alpha$ -спиральности (H. Ojha et al. 2009). Однако по данным авторов, в результате этого, температура денатурации комплекса возрастает, при этом, этот эффект интерпретируется на основании флуоресцентных измерений, которые указывают на гидрофобные взаимодействия между лигандом и белком, и КД-денатурации (H. Ojha et al. 2009).

Однако, полученные нами данные указывают на обратное, поскольку кривые денатурации комплексов H33258 с альбумином при соотношении 1:1 сдвигаются в сторону низких температур, при этом, температура денатурации по абсолютной величине уменьшается примерно на 5 градусов. Наряду с уменьшением температуры денатурации, имеет место и уменьшение интервала перехода, как и в случае МС.

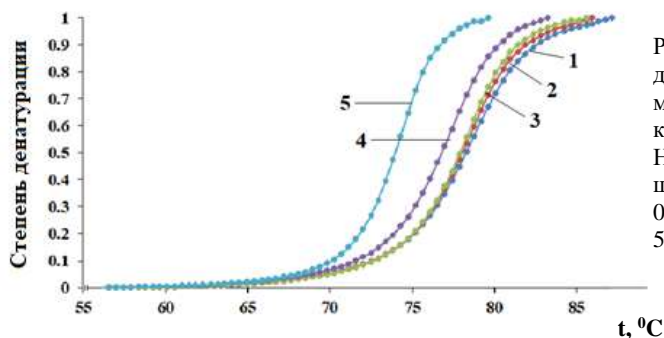


Рис. 2. Кривые денатурации альбумина (1) и его комплексов с H33258, при соотношениях r: 1) 0; 2) 0,02; 3) 0,1; 4) 0,2 и 5) 1,0.

Необходимо также отметить, что нормализованные кривые денатурации альбумина и его комплексов с H33258, как и в случае МС, соответствуют однофазному переходу. Следовательно, и при связывании H33258 альбумин не претерпевает таких структурных изменений, которые могут изменить однофазный переход этой макромолекулы в денатурированное состояние.

Значительные изменения в параметрах денатурации комплексов альбумин-H33258 указывают на то, что этот лиганд, который является ДНК специфическим желобковым соединением, может связываться и с протеинами, в частности, с альбумином крови. Более того, очевидно, что связываясь с альбумином, H33258 влияет на его структуру, поскольку вызывает разрыхление нативной структуры белка. Этот эффект выражается тем, что имеет место потеря  $\alpha$ -спиральности полипептидной цепи белка. При этом, по всей вероятности эти изменения в равной мере затрагивают все три домена и субдомена, вследствие чего и кривые денатурации комплексов остаются однофазными. Мы полагаем, что H33258 с альбумином взаимодействует за счет водородных связей, в результате чего и происходит частичная потеря  $\alpha$ -спиральности альбумина и, последующая этому, дестабилизация структуры белка. Фактически, H33258 вызывает так называемую “разупаковку” трехмерной структуры протеина.

Таким образом, полученные данные по УФ-денатурации комплексов ДНК-специфических лигандов МС и Hoechst 33258 показывают, что эти лиганды связываются с альбумином и инициируют конформационные перестройки в молекуле

белка. Однако эти изменения имеют разнонаправленный характер, что отражается на структурной стабильности макромолекулы: в случае Н33258 обнаруживается уменьшение упорядоченности ( $T_m$  комплексов уменьшается), в то время как в случае МС наоборот, имеет место увеличение степени упорядоченности ( $T_m$  комплексов возрастает) пространственной структуры белка.

**Сравнительное исследование взаимодействия МС и Н33258 с альбумином и ДНК.** Из кривых денатурации получены значения температур денатурации альбумина и его комплексов с МС и Н33258. В случае МС, по мере возрастания концентрационного соотношения  $г$ , температура денатурации возрастает, достигая своего максимума при  $г \approx 1$ . В то же время, интервал денатурации комплексов уменьшается, относительно интервала денатурации белка, однако, этот параметр при низких соотношениях уменьшается резко, затем, с увеличением значений  $г$  возрастает, однако, при  $г \approx 1$  остается меньшим, чем интервал денатурации белка (рис. 1 и 2). В случае же Н33258 обнаружено, что уменьшается не только интервал, но и температура денатурации. При этом, наибольшее значение изменения температуры денатурации получается при значении  $г \approx 1$ .

Как уже выше было указано, уменьшение температуры денатурации комплексов альбумин-Н33258 обусловлено существенным разворачиванием структуры белка в результате потери  $\alpha$ -спиральности. Наряду с этим, уменьшается также интервал денатурации комплексов, однако, в противоположность МС, этот параметр денатурации также проявляет тенденцию возрастания по абсолютной величине, с увеличением концентрации Н33258.

При взаимодействии с ДНК, МС, как и большинство лигандов-интеркаляторов, проявляет стабилизирующее влияние на двухцепочечную (дц) структуру нуклеиновой кислоты (Vardevanyan et al. 2015). Поэтому, при связывании таких лигандов с дц-ДНК имеет место возрастание температуры перехода ДНК в одноцепочечное (оц) состояние. Результаты исследований (данные получены нами для сравнения и не приводятся) по плавлению комплексов МС-ДНК показывают, что стабилизация дц-структуры ДНК зависит от концентрации лиганда и при значении  $г = 0,167$  температура плавления комплексов возрастает на  $8-10^0$ , по сравнению с температурой плавления ДНК. Аналогичный сдвиг происходит и при термоденатурации альбумина и его комплексов с МС. С другой стороны, нативную форму белка этот лиганд стабилизирует намного меньше, чем в случае ДНК (см. рис. 1).

Выше было отмечено, что основная движущая сила связывания МС с альбумином электростатическая, которая неспецифическая, несмотря на существование гидрофобного Сайта I в молекуле протеина. В ДНК также существуют гидрофобные и гидрофильные участки, которые являются центрами адсорбции для лигандов. По сравнению с альбумином, гидрофобные центры адсорбции (межплоскостные пространства между соседними нуклеотидами или пар нуклеотидов) для МС являются специфическими сайтами связывания, с которыми этот лиганд взаимодействует интеркаляционным механизмом. Неспецифический же механизм связывания МС с ДНК осуществляется электростатическим механизмом, в результате которого молекулы лиганда связываются с достаточно гидрофильным сахаро-фосфатным остовом ДНК.

При взаимодействии же Н33258 с ДНК температура плавления комплексов увеличивается, в то время как при связывании с альбумином наоборот, температура денатурации уменьшается из-за разрушения пространственной структуры



макромолекулы. При этом, этот лиганд локализуется в более гидрофобном малом желобке ДНК за счет ван-дер-Ваальсовых взаимодействий со стенками этого желобка, а также водородными связями с АТ парами, в результате чего гетерогенность между АТ и ГЦ (гуанин-цитозиновым) парами уменьшается. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению  $\Delta T$  Н33258-ДНК относительно  $\Delta T_0$  ДНК. При электростатическом способе связывания этого лиганда с ДНК аналогичный эффект не наблюдается. Исходя из этого, можно полагать, что Н33258 может образовывать водородные связи также с аминокислотными остатками альбумина, что, по всей вероятности, и приводит к потере  $\alpha$ -спиральности полипептидной цепи белка и уменьшению температуры денатурации. Из значений температуры денатурации получены значения увеличения этого параметра комплексов при различных концентрационных соотношениях  $\gamma$  и построены кривые зависимости  $\Delta T_m$  от  $\gamma$  (рис. 3 и 4).

Из рис. 3 видно, что кривая 1, соответствующая комплексам МС-ДНК, значительно круче, чем, кривая 2, соответствующая комплексам МС-альбумин. Фактически, при одинаковых концентрационных соотношениях увеличение  $T_m$  комплексов МС-ДНК примерно в 4 раза больше, чем в случае комплексов МС-белок. Этот факт можно объяснить, исходя из того, что на ДНК для МС (как и для других лигандов интеркаляторов или желобковых соединений) присутствуют центры адсорбции по крайней мере двух типов, с которыми МС связывается различными константами ассоциации -  $K_1$  и  $K_2$ . При этом, литературные данные указывают на то, что  $K_1/K_2 \approx 10$ , поскольку один из способов, более сильный, реализуется интеркаляционным, другой, более слабый, электростатическим способами, которые и стабилизируют двухцепочечную структуру ДНК.

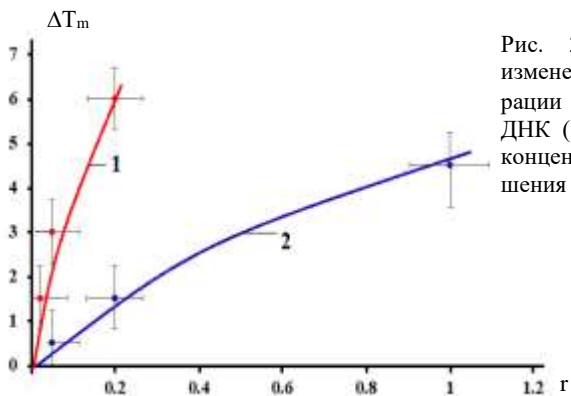


Рис. 3. Кривые зависимости изменений температуры денатурации ( $\Delta T_m$ ) комплексов МС-ДНК (1) и МС-альбумин (2) от концентрационного соотношения  $\gamma$ .

В случае альбумина, наибольший эффект стабилизации получается при  $\gamma \approx 1$ , что подтверждает факт о том, что альбумин содержит один центр адсорбции для этого лиганда. Не исключается, что константа ассоциации лиганда с этим центром меньше, чем константы ассоциации МС с ДНК указанными способами.

Аналогично, и в случае Ноеchst 33258 (Н33258) наблюдается большой сдвиг температуры перехода в сторону стабилизации нативной структуры ДНК. На рис. 4 приведены зависимости  $\Delta T_m$  от  $\gamma$ , полученные для комплексов Н33258 с ДНК с белком. Как видно из приведенного рисунка, кривая 1 имеет бо'льшую крутизну. При этом,  $T_m$  комплексов Н33258-ДНК намного больше, чем в случае МС (рис. 3). С этой точки зрения, поскольку в случае комплексов Н33258-альбумин наблюдается

радикально иная картина, так как кривые зависимости комплексов сдвигаются в сторону низких температур, то это указывает на денатурирующее влияние Н33258 на структуру белка. Известно, что Н33258 с ДНК также связывается более чем одним способом, которые, в совокупности, значительно стабилизируют ее дц-структуру. Более того, взаимодействие этого лиганда с ДНК различными способами характеризуется высокими значениями констант ассоциации. С другой стороны, дестабилизирующее влияние Н33258 на пространственную структуру альбумина нельзя обуславливать меньшим значением константы ассоциации, а денатурирующее влияние может быть результатом разрыва сил, стабилизирующих пространственную структуру белка, а также изменения в микроокружении поверхности белка. Следовательно, из полученных нами данных можно заключить, что влияние различных лигандов на структуру биомолекул может иметь разнонаправленный характер, что лежит в основе их биологической активности.

Полученные данные позволяют заключить, что взаимодействие МС и Н33258 с ДНК осуществляется как специфически (интеркаляционный механизм), так и неспецифически (электростатический механизм).

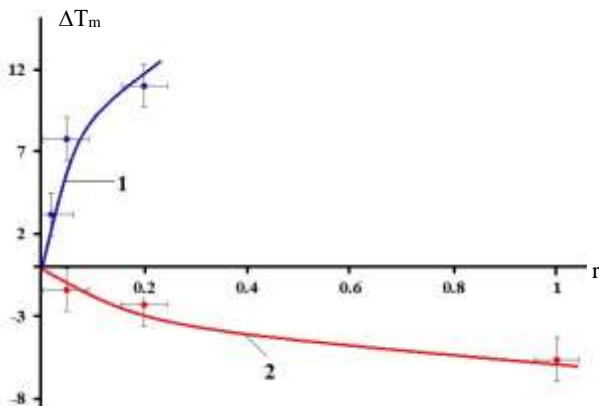


Рис. 4. Кривые зависимости изменений температуры денатурации ( $\Delta T_m$ ) комплексов Н33258-ДНК (1) и Н33258-альбумин (2) от  $r$ .

В случае альбумина определенный специфический механизм связывания хотя не обнаруживается методом УФ-денатурации, тем не менее, не исключается, что с белком эти лиганды также связываются за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий или образования водородных связей, которые в совокупности приводят к увеличению фолдинга (в случае МС) белка и к стабилизации его молекулы относительно температуры, как денатурирующего фактора или к разворачиванию (в случае Н33258). Эти результаты могут также пролить свет на особенности депонирования и транспортировки специфических к нуклеиновым кислотам биологически активных соединений к мишеням (к ДНК или РНК). Это, в свою очередь, может иметь важное биологическое значение, так как может лечь в основу модуляции разнообразных клеточных процессов с помощью биологически активных соединений. Важно также отметить, что биологически активные соединения, в том числе, лекарственные, должны проходить тестирование на сродство с альбумином крови, для оценки влияния их эффективных концентраций на организм.

**Исследование связывания МС и Н33258 с альбумином методами абсорбционной и дифференциальной спектроскопии.** Взаимодействие МС с альбумином изучалось

методами абсорбционной и дифференциальной спектроскопии. Получены спектры поглощения комплексов МС-альбумин (спектры не приводятся), которые уменьшаются относительно спектра МС, однако их изменение небольшое. Важно отметить, что в случае белка изобестическая или псевдоизобестическая точка не образуются, как в случае ДНК. Небольшое уменьшение максимумов спектров комплексов относительно спектра свободного МС позволяет предположить, что в связанном состоянии у молекул этого лиганда степень относительной свободы мало отличается от таковой несвязанных молекул (E. Alarcon et al. 2005). Тем не менее, монотонное уменьшение спектров поглощения комплексов по мере возрастания  $\gamma$  указывает на то, что МС образует комплексы с альбумином, как это было обнаружено и методом УФ-денатурации.

Получены также дифференциальные спектры поглощения комплексов МС с белком, которые приведены на рис. 5.

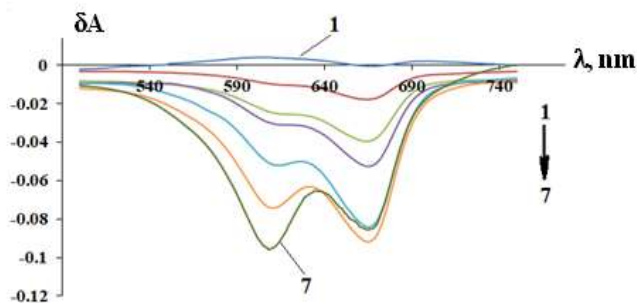


Рис. 5. Дифференциальные спектры поглощения МС (1) и его комплексов (2-7) с бычьим сывороточным альбумином. Концентрация МС оставалась постоянной, концентрация белка возрастала в интервале изменения  $\gamma$  –  $0,2 \leq \gamma \leq 5,0$ .

Из приведенного рисунка видно, что в случае дифференциальных спектров имеет место более значительное изменение. При этом, абсолютные значения дифференциальных спектров поглощения уменьшаются в зависимости от  $\gamma$  (кривые 1-6), затем уменьшение практически прекращается. Этот эффект проявляется при соотношении  $\sim 1:1$  что, по всей вероятности, указывает на то, что места связывания МС с альбумином ограничены. На этих спектрах также изобестическая или псевдоизобестическая точка не образуются. Этот результат указывает на то, что места связывания МС с этим белком ограничены. По всей вероятности, молекулы МС могут локализоваться во внутренней полости, в более гидрофильных участках протеина (E. Alarcon et al. 2005).

Амплитуды спектров поглощения (спектры не приводятся) комплексов Н33258 с альбумином также уменьшаются по мере возрастания  $\gamma$ . Это подтверждает факт, выявленный методом УФ-денатурации, что и ДНК-специфический лиганд Н33258 связывается с альбумином, что сопровождается гипохромным эффектом. Из приведенного рисунка видно, что степень гипохромности небольшая.

На рис. 6 приведены дифференциальные спектры поглощения комплексов Н33258 с альбумином, которые состоят из двух пиков: положительных – в интервале изменения  $300 \leq \lambda \leq 350$  нм и отрицательных – в интервале  $350 \leq \lambda \leq 450$  нм. При этом, максимумы положительных пиков соответствовали  $\lambda \approx 335$  нм, отрицательных пиков –  $\lambda \approx 380$  нм. Из приведенного рисунка видно, что положительные пики дифференциальных спектров (коротковолновые пики), возрастают по мере

увеличения  $\gamma$ , в то время как отрицательные (длинноволновые) пики наоборот, уменьшаются. Гипохромный эффект, проявляющийся как на дифференциальных, так и на спектрах поглощения комплексов, при длине волны поглощения свободных молекул лиганда является результатом перехода его хромофорных (бензимидазольных) групп в связанное состояние.

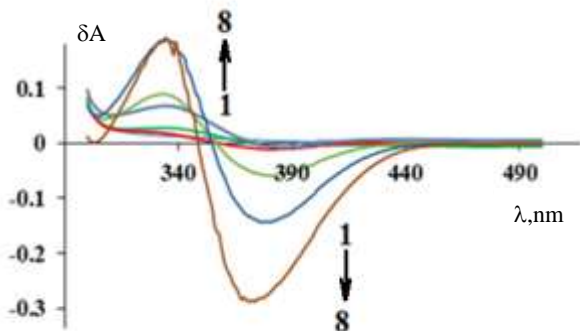
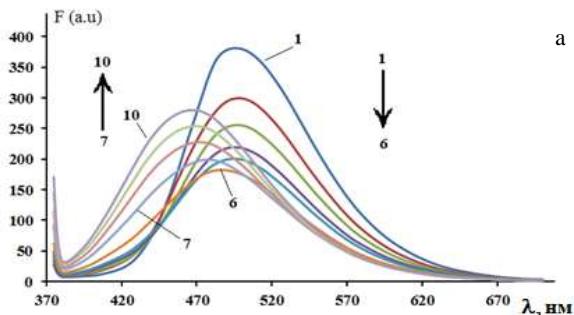


Рис. 6. Дифференциальные спектры поглощения H33258 (1) и его комплексов (2-8) с альбумином. Концентрация H33258 оставалась постоянной, концентрация белка возрастала в интервале изменения  $\gamma$  –  $0,2 \leq \gamma \leq 5,0$ .

При этом, имеет место небольшой гипсохромный эффект, проявляющийся в дифференциальных спектрах поглощения комплексов, с выраженным гиперхромизмом положительных и гипохромизмом – отрицательных пиков. Это указывает на изменение микроокружения и увеличение полярности в непосредственном окружении связанных молекул лиганда. При этом, гипохромный эффект происходит при относительно длинных волнах, что подтверждает факт о том, что молекулы этого лиганда образуют водородные связи с аминокислотными остатками  $\alpha$ -спиралей белка, в результате чего имеет место уменьшение параллельных диполь-дипольных взаимодействий (Shahbazi Z., 2015).

Гиперхромное изменение при относительно коротких, и гипохромное, при относительно длинных волн дифференциальных спектров комплексов H33258 с альбумином являются результатом того, что имеет место конформационное изменение белка в результате связывания H33258. Не исключается также то, что гипохромный эффект обусловлен стопкообразным расположением ароматических бензимидазольных групп связанных молекул H33258 (Ackerman et al, 2016). Таким образом, учитывая, что температура денатурации альбумина в комплексе с H33258 уменьшается, мы заключаем, что указанные выше гипер- и гипохромные эффекты обусловлены частичной потерией  $\alpha$ -спиральности полипептидных цепей альбумина, вызванных связыванием этих участков с H33258.

Нами получены также спектры флуоресценции комплексов H33258 с альбумином (рис. 7), которые регистрировались в интервале  $350 \leq \lambda \leq 700$  нм. Как видно из приведенного рисунка, интенсивность флуоресценции H33258 (кривая 1), при взаимодействии с альбумином уменьшается, по мере возрастания концентрации белка в растворе. Так, при изменении концентрационного соотношения  $\gamma$  в интервале  $0 \leq \gamma \leq 1,0$  (кривые 2-6), имеет место уменьшение интенсивности флуоресценции, а при дальнейшем увеличении концентрации белка в растворе, происходит возрастание интенсивности флуоресценции. При этом, спектры



а Рис. 7. Спектры флуоресценции H33258 (1) и его комплексов с альбумином (2-10).

флуоресценции комплексов H33258-альбумин при низких концентрациях белка (2-6) не сдвигаются в коротковолновую или длинноволновую область. Эти особенности указывают на то, что флуоресценция H33258 при комплексообразовании с альбумином тушится молекулами белка по мере увеличения концентрации биомолекулы вплоть до соотношения 1:1 (кривая 6). Однако, при дальнейшем увеличении концентрации альбумина –  $1.0 < r \leq 5.0$ , спектры флуоресценции сдвигаются в коротковолновую область и возрастают в максимумах. Этот эффект может являться результатом того, что при взаимодействии с H33258 конформация альбумина претерпевает определенные изменения во вторичной и третичной структурах, в результате чего молекулы лиганда могут переходить в более гидрофобное окружение. Очевидно, что этот эффект может иметь место при связывании H33258 с гидрофобными участками белка, что термодинамически выгодно, поскольку в результате потери  $\alpha$ -спиральности белок частично разворачивается, вследствие чего его гидрофобные участки могут вступать в нежелательные контакты с водой. При этом, за-счет связывания с H33258 эти участки могут эффективно экранироваться от воды. В свою очередь, гидрофобные бензимидазольные группы также могут экранироваться от воды, что и приводит к увеличению флуоресценции.

**Оценка термодинамических параметров комплексов МС и H33258 с альбумином, на основании спектральных исследований.**

На основании спектров абсорбции или флуоресценции можно проводить термодинамический анализ комплексов макромолекул с лигандами. Были получены спектры флуоресценции МС и H33258 и их комплексов с альбумином при температурах 298; 308 и 318 К соответственно (спектры не приводятся). Полученные спектры интенсивности флуоресценции по своим характеристикам не отличались от таковых, полученных для МС и H33258. По мере возрастания концентрации белка в растворе максимумы спектров флуоресценции уменьшались из-за тушения.

При возрастании температуры, этот эффект и в случае МС, и в случае H33258 проявлялся в ходе титрования раствором альбумина. На основании анализа спектров интенсивностей флуоресценции комплексов МС-альбумин и H33258-альбумин построены кривые тушения методом Штерна-Вольмера при указанных температурах (кривые не приводятся). При статическом тушении кривая Штерна-Вольмера имеет прямолинейную форму (Liu X. & Wu X., Yang J., 2010).

С этой точки зрения, кривые тушения, полученные для комплексов МС при 308 и 318 К являются результатом динамического и статического тушения.

Таблица 1.

Значения констант тушения Штерна-Вольмера для комплексов альбумина с МС и Н33258

Температура (К)	Значения $K_{SV}$ (л/моль)	
	МС-САЧ; $10^3$	Н33258-САЧ; $10^4$
298	$8.6 \pm 0.14$	$7.04 \pm 0.15$
308	$4.6 \pm 0.15$	$3.5 \pm 0.12$
318	$2.8 \pm 0.12$	$2.15 \pm 0.11$

В случае Н33258 такой эффект не обнаружен, поэтому можно считать, что тушение только статическое. Значения констант тушения Штерна-Вольмера приведены в таблице 1. Из данных таблицы 1 выявляется, что значения констант Штерна-Вольмера как в случае МС, так и Н33258 уменьшаются с увеличением температуры. Это свидетельствует о том, что происходит статическое тушение, тогда как при динамическом тушении эти значения должны были возрастать с увеличением температуры. Видно также, что более эффективно тушение имеет место в случае взаимодействия Н33258 с альбумином.

Уменьшение значений  $K_{SV}$  при высоких значениях температуры обусловлено тем, что вероятность взаимодействия белка и лиганда уменьшается из-за увеличения тепловой энергии. На основании полученных данных, получены значения  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  и  $\Delta G^0$ . Значения указанных термодинамических параметров ( $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$ ,  $\Delta G^0$ ) обобщены в таблице 2. Как видно из результатов, представленных в указанной таблице, для всех типов комплексов, значения всех трех термодинамических параметров уменьшаются.

По методу (Ross & Subramanian, 1981) оценки сил взаимодействия органических микро- и биологических макромолекул, гидрофобная сила взаимодействия увеличивает  $\Delta H$  и  $\Delta S$  системы, в то время как водородные связи и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия уменьшают эти значения.

Сила электростатического взаимодействия приводит к значениям  $\Delta H^0 \approx 0$  и  $\Delta S^0 > 0$ . С другой стороны, отрицательное значение  $\Delta G^0$  свидетельствует о спонтанности процесса взаимодействия. Основываясь на вышеотмеченных предположениях и исходя из полученных данных, мы предполагаем, что, при взаимодействии МС и Н33258 с альбумином, водородные связи и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия играют важнейшую роль в процессе связывания, которая является спонтанной. Учитывая, что абсолютное значение  $\Delta H$  больше, чем абсолютное значение  $\Delta S$ , благодаря чему значение  $\Delta G$  также имеет отрицательный знак, образование комплекса лиганд-альбумин термодинамически выгодно, несмотря на то, что с энтропийной точки зрения оно не желательно.

Стоит также отметить, что Н33258 проявляет более выраженное сродство к альбумину. Литературные данные свидетельствуют о том, что Н33258 также связывается с ДНК-топоизомеразой 1. Это может иметь важное значение для влияния на функциональные особенности ДНК посредством комплексов Н33258 с различными белками, модулируя клеточную активность.

Таблица 2.

Значения термодинамических параметров связывания комплексов альбумина с МС и Н33258.

	$\Delta H^0$ , кДж/моль	$\Delta S^0$ , Дж/моль·К	$\Delta G^0$ , кДж/моль
МС-САЧ	-44.4±0.4	-73.4±0.3	-22.5±0.3
Н33258-САЧ	-46.8±0.5	-64.3±0.3	-27.6±0.3

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что альбумин может образовать комплексы с ДНК-специфическими лигандами МС и Н33258, что выявляется из статического тушения интенсивностей флуоресценции этих комплексов. Комплексообразование происходит благодаря водородным связям и ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям между лигандами и альбумином. Этот факт основывается на расчете термодинамических параметров – энтропии и энтальпии. С другой стороны, этот процесс является спонтанным, о чем свидетельствует отрицательное значение свободной энергии Гиббса. Значение константы тушения Штерна-Вольмера больше в случае комплексов Н33258-альбумин по сравнению с комплексами МС-альбумин. С увеличением температуры наблюдается уменьшение значений  $K_{sv}$ , что означает, что тепловая энергия приводит к увеличению подвижности молекул в растворе, что в свою очередь, вызывает дестабилизацию образовавшихся комплексов и диссоциацию связанных молекул лиганда. Следует также отметить, что в случае связывания МС, при относительно высоких концентрациях белка тушение происходит двумя – статическим и динамическим способами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведены исследования по взаимодействию ДНК-специфических лигандов МС и Н33258 с альбумином крови. В основном были использованы сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА), которые структурно аналогичны и различаются тем, что БСА содержит два триптофановых остатка вместо одного в САЧ.

Проведенные исследования по взаимодействию ДНК-специфических лигандов, тиозинового красителя МС и бисбензимидазного соединения Н33258 указывают на то, что, в частности МС, который связывается с ДНК несколькими способами, взаимодействует также с альбумином, однако не проявляет какой-либо специфичности к протеину. Более того, предпочтительным для связывания МС в случае альбумина становятся относительно гидрофильные участки (Сайт I), поскольку основную роль при связывании этого лиганда играет неспецифическое электростатическое взаимодействие.

Выявлено, что желобково связывающееся с ДНК соединение Hoechst 33258, как и МС, также взаимодействует с альбумином. При этом, полученные данные указывают, что эти лиганды инициируют разнонаправленные конформационные перестройки в молекуле белка, что отражается на структурной стабильности

макромолекулы: в случае Н33258 обнаруживается некоторое уменьшение упакованности ( $T_m$  комплексов уменьшается), в то время как в случае МС наоборот, имеет место увеличение степени упакованности ( $T_m$  комплексов возрастает) пространственной структуры белка.

Необходимо отметить, что взаимодействие МС и Н33258 с ДНК осуществляется как специфически (интеркаляционный механизм в случае МС, желобковое связывание в случае Н33258, который, при этом, проявляет выраженную специфичность к АТ парам ДНК), так и неспецифически (электростатический механизм) (Vardevanyan et al, 2013; 2015; 2016; 2020). В случае альбумина определенный специфический механизм связывания не обнаруживается, однако не исключается, что с белком эти лиганды могут связываться и за счет гидрофобных, и электростатических взаимодействий или водородных связей, которые в совокупности приводят к увеличению фолдинга белка и к стабилизации его молекулы относительно температуры, как денатурирующего фактора.

Полученные нами данные также выявляют, что интенсивность флуоресценции Н33258 при связывании с белком уменьшается при низких и возрастает при относительно больших концентрациях белка. Это указывает на то, что в формировании комплексов важную роль играют гидрофобные взаимодействия, приводящие к возрастанию интенсивности флуоресценции Н33258-альбумин комплексов, при больших концентрациях белка. Очевидно, что изменения флуоресценции комплексов обусловлены изменениями микроокружения, связанных с альбумином молекул лиганда, и указывают на существование двух типов центров в молекуле белка – гидрофильного и гидрофобного. При этом, гидрофобное взаимодействие Н33258 с альбумином является следствием гидрофильного связывания, в результате которого Н33258 вызывает разворачивание пространственной структуры протеина. Вследствие этого, по всей вероятности, конформация белка изменяется таким образом, что гидрофобные аминокислотные остатки становятся доступными для бисбензимидазольных (гидрофобных) групп лиганда. Следовательно, при образовании гидрофобных контактов между ними, молекулы лиганда будут экранироваться от тушителей (молекул воды, растворенного кислорода).

На основании полученных результатов можно заключить, что Н33258 с альбумином образует водородные связи а также связывается за счет ван-дер-Ваальсовых, а МС – электростатических взаимодействий. При этом выявлено, что связывание и Н33258, и МС с альбумином обусловливается энтальпийно-энтропийным компенсаторным механизмом, о чем свидетельствует отрицательное значение изменения свободной энергии Гиббса. Данное исследование позволяет утверждать, что альбумин в крови играет основную роль в депонировании и транспортировке различных лигандов до мишени. Результаты данной работы могут пролить свет на возможные механизмы доставки различных лекарственных, а также биологических веществ к своим мишеням.

Эти данные важны и с той точки зрения, что могут лечь в основу дизайна и скрининга новых лекарственных веществ, а также тестировки этих соединений на связывание с альбумином, их депонирование этим белком, и изменение их эффективности в *in vivo* системах.



## ВЫВОДЫ

1. Метиленовый синий (МС) связывается с альбумином, не проявляя какой-либо специфичности к протеину, при этом, предпочтительным для связывания МС являются относительно гидрофильные участки альбумина. При взаимодействии МС с альбумином основную роль в связывании играет неспецифическое электростатическое взаимодействие, в результате чего температура денатурации ( $T_m$ ) комплексов возрастает.
2. Hoechst 33258 связывается с альбумином, в результате чего температура денатурации ( $T_m$ ) комплексов уменьшается относительно этого параметра белка. Связывание Hoechst 33258 с альбумином осуществляется за счет водородных связей, которые образуются между молекулами лиганда и аминокислотными остатками  $\alpha$ -спиралей белка.
3. Связывание с альбумином и Hoechst 33258, и МС, приводит к конформационным перестройкам в молекуле белка. При этом, эти изменения имеют разнонаправленный характер, что отражается на структурной стабильности макромолекулы: в случае Н33258 обнаруживается уменьшение степени упакованности, в случае же МС наоборот, имеет место увеличение компактизации пространственной структуры белка.
4. Величины максимумов спектров поглощения и флуоресценции комплексов МС с альбумином проявляют тенденцию к уменьшению в зависимости от возрастания концентрации белка, на что указывают изменения в дифференциальных спектрах поглощения. Анализ изменений этих спектров позволяет утверждать, что места связывания МС с белком ограничены, при этом предпочтительными являются гидрофильные участки протеина.
5. Спектры поглощения и флуоресценции комплексов Н33258 с альбумином уменьшаются в максимумах по мере возрастания концентрации белка в растворе. При этом, на дифференциальных спектрах поглощения проявляется гипсохромный сдвиг с выраженным гиперхромизмом положительных пиков, и гипохромизмом отрицательных пиков. Это указывает на увеличение полярности в непосредственном окружении связанных молекул Н33258.
6. Комплексообразование Н33258 с альбумином осуществляется за счет водородных связей и ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, в случае МС – электростатических взаимодействий. Связывание и Н33258, и МС с альбумином обуславливается энтальпийно-энтропийным компенсаторным механизмом, о чем свидетельствует отрицательное значение изменения свободной энергии Гиббса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Vardevanyan P.O., Mikaelyan M.S., Petrosyan N.H. Bovine serum albumin denaturation in the presence of Hoechst 33258 and methylene blue. Proc. of The Yerevan State University, Chem and Biol, 2020, v. 54, N3, p. 204-208.
2. Antonyan A., Petrosyan N., Vardevanyan P. Comparison of the interaction of methylene blue and Hoechst 33258 with HSA. V Intern. Conf. of Biotech. and Health, Book of Abstracts, October 29-31, 2020, Yerevan, Armenia, p. 14-15.
3. Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H., Vardevanyan P.O. Comparison of interaction of methyl violet and methylene blue with human serum albumin. Biolog. J. of Armenia, 2020, v. 72, N4, p. 61-66.
4. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H., Mamasakhlov Y.S. Spectroscopic study of protein complexes with low-molecular compounds. J. of Contemporary Physics (AAS), 2021, v. 56, N1, p. 60-64.
5. Petrosyan N.H. Study of absorption spectra of the complexes of bovine serum albumin with Hoechst 33258 and methylene blue. Proc. of The YSU, Chem and Biol, 2021, v. 55, N2, p. 158-164.
6. Антонян А.П., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Сравнительное исследование спектральных характеристик комплексов Hoechst 33258 и МС с БСА. Журнал прикладной спектроскопии. 2021, т. 88, N6, с. 942-947.
7. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H. Study of interaction of methylene blue with DNA and albumin. J. of Biomol. Struct. and Dyn., 2022, v.40, N17, p.7779-7785.
8. Антонян А.П., Парсаданян М.А., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Флуоресцентные характеристики комплексов Hoechst 33258 с сывороточным альбумином и ДНК. Журнал прикладной спектроскопии. 2022, т. 89, N4, с. 517-522.
9. Vardevanyan P.O., Petrosyan N.R. Study of structural transitions of complexes of different ligands with DNA and BSA. Proc. of The YSU, Chem and Biol, 2022, v. 56, N1, p. 49-55.

ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ ՆԱՐԱ ՀՐԱՉԻԿԻ

ԴԼԹ-ՍՊԵՑԻՖԻԿ ԼԻԳԱՆԴԵՐ ՄԵԹԻԼԵՆԱՅԻՆ ԿԱՊՈՒՅՏԻ ԵՎ HOECHST  
33258-Ի ԿԱՊՈՒՄԸ ՇԻՃՈՒԿԱՅԻՆ ԱԼԲՈՒՄԻՆԻ ՉԵՏ

ԱՄՓՈՓՈԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ալբումին, սպիտակուցի բնավոխում, մեթիլենային կապույտ, Hoechst 33258, ֆլուորեսցենցիա, ալբումին-լիզանդ կոմպլեքսներ

Աշխատանքում բերված են ԴԼԹ-սպեցիֆիկ լիզանդներ մեթիլենային կապույտի (ՄԿ) և Hoechst 33258-ի (H33258) փոխազդեցության հետազոտությունները արյան ալբումինի հետ: Հիմնականում կիրառվել են մարդու շիճուկային ալբումինը (ՄՇԱ) և ցուլի շիճուկային ալբումինը (ՑՇԱ), որոնք կառուցվածքային առումով համանման են և տարբերվում են նրանով, որ ՑՇԱ-ն պարունակում է երկու տրիպտոֆանային մնացորդ, ՄՇԱ-ն՝ մեկ:

ԴԼԹ-սպեցիֆիկ լիզանդներ թիազինային ներկանյութ ՄԿ-ի և բիս-բենզիմիդազոլային միացություն H33258-ի փոխազդեցության հետազոտությունները վկայում են այն մասին, որ, մասնավորապես, ՄԿ-ը, որը ԴԼԹ-ի հետ կապվում է մի քանի եղանակներով, փոխազդում է նաև ալբումինի հետ, սակայն որևէ սպեցիֆիկություն չի ցուցաբերում սպիտակուցի նկատմամբ: Ավելին, ալբումինի դեպքում ՄԿ-ի կապման համար նախընտրելի են դառնում հարաբերականոթեն հիդրոֆիլ տեղամասերը, քանի որ այս լիզանդի կապման դեպքում հիմնական դերը պատկանում է ոչ սպեցիֆիկ էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությանը:

Բացահայտվել է, որ ԴԼԹ-ի հետ ակոսային կապվող միացություն H33258-ը, ինչպես և ՄԿ-ն, փոխազդում է ալբումինի հետ: Ընդ որում, ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ այս լիզանդները հրահրում են տարբեր ուղղվածություն ունեցող կոնֆորմացիոն փոփոխություններ սպիտակուցի մոլեկուլում, ինչն արտահայտվում է մակրոմոլեկուլի կառուցվածքային կայունության վրա: H33258-ի դեպքում ի հայտ է գալիս փաթեթավորվածության որոշակի նվազում (կոմպլեքսների T<sub>m</sub>-ը նվազում է), մինչդեռ ՄԿ-ի դեպքում, ընդհակառակը, տեղի ունի սպիտակուցի տարածական կառուցվածքի փաթեթավորվածության աստիճանի աճ (կոմպլեքսների T<sub>m</sub>-ը աճում է):

Անհրաժեշտ է նշել, որ ՄԿ-ի և H33258-ի փոխազդեցությունը ԴԼԹ-ի հետ իրականանում է ինչպես սպեցիֆիկորեն (ՄԿ-ի դեպքում ինտերկալյացիոն մեխանիզմ, H33258-ի դեպքում ակոսային կապում, ընդ որում վերջին դեպքում ի հայտ է գալիս վառ սպեցիֆիկություն ԴԼԹ-ի AT-գույգերի նկատմամբ), այնպես էլ ոչ սպեցիֆիկորեն (էլեկտրաստատիկ մեխանիզմ): Ալբումինի դեպքում չի հայտնաբերվում որոշակի սպեցիֆիկ կապման մեխանիզմ, սակայն չի բացառվում, որ սպիտակուցի հետ այս լիզանդները կարող են կապվել հիդրոֆոբ և էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունների կամ ջրածնական կապերի հաշվին,

որոնք միասին հանգեցնում են սպիտակուցի ֆոլդինգի աճին և ջերմաստիճանի՝ որպես դենատուրացնող գործոնի, նկատմամբ դրա մոլեկուլի կայունության մեծացմանը:

ՈԻՄ-դենատուրացման արդյունքները, սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունների տվյալների հետ համատեղ բացահայտում են, որ տեղի է ունենում ալբումինի  $\alpha$ -պարուրվածության կորուստ՝ H33258-ի հետ փոխազդեցության դեպքում: Նշենք, որ ՇԴ-դենատուրացման մեթոդով ցույց է տրվել, որ ալբումինի  $\alpha$ -պարուրվածության կորուստը հանգեցնում է T<sub>m</sub>-ի աճին՝ 5 °C-ով: Սակայն մեր աշխատանքում ստացված տվյալները հակառակն են բացահայտում, քանի որ ալբումինի հետ H33258-ի կոմպլեքսների (համալիրների) դենատուրացման ջերմաստիճանը նվազում է: Հիմնվելով այն բանի վրա, որ այդ համալիրների դիֆերենցիալ սպեկտրների վրա ի հայտ է գալիս հիպսաքրոմ շեղում, մենք կարծում ենք, որ ալբումինի  $\alpha$ -պարուրվածության մասնակի կորուստը հանգեցնում է սպիտակուցի կառուցվածքի ապակայունացմանը, այսինքն սպիտակուցի եռաչափ կառուցվածքի խախտմանը:

Ստացված տվյալները նաև բացահայտում են, որ H33258-ը ալբումինի հետ առաջացնում է ջրածնական կապեր, նաև կապվում է վան-դեր-Վաալսյան, իսկ ՄԿ-ն՝ էլեկտրաստատիկ փոխազդեցությունների հաշվին: Ընդ որում, ցույց է տրվել, որ և H33258-ի, և ՄԿ-ի կապումը ալբումինի հետ պայմանավորված է էնթալպիական-էնթոթալպիական փոխհատուցող մեխանիզմով, ինչի մասին վկայում է Գիբբսի ազատ էներգիայի փոփոխության բացասական արժեքը: Իրականացված հետազոտություններն ու ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ արյան մեջ ալբումինն իրականացնում է տարբեր լիզանոլների դեպոնավորման, ինչպես նաև տեղափոխության հիմնական դերը մինչև թիրախներ: Այս տեսանկյունից, տվյալ աշխատանքի արդյունքները կարող են լուսաբանել տարբեր դեղաբանական, ինչպես նաև կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների տեղափոխման հնարավոր մեխանիզմները մինչև իրենց թիրախներ:

Այս տվյալները կարևոր են նաև այն տեսանկյունից, որ կարող են հիմք հանդիսանալ նոր դեղաբանական միացությունների դիզայնի և սկրինինգի, ինչպես նաև ալբումինի հետ դրանց կապման թեստավորման համար, տվյալ սպիտակուցի կողմից դրանց դեպոնացման և *in vivo* համակարգերում դրանց արդյունավետության փոփոխման դեպքում:

BINDING OF DNA-SPECIFIC LIGANDS METHYLENE BLUE AND HOECHST 33258  
WITH SERUM ALBUMIN

SUMMARY

Keywords: albumin, protein denaturation, Methylene Blue, Hoechst 33258, fluorescence, albumin-ligand complexes

In this work the studies on the interaction of DNA-specific ligands – methylene blue (MB) and Hoechst 33258 (H33258) with blood albumin have been carried out. Human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA) were mainly used, which are structurally analogous and differ by the fact that BSA contains two tryptophane residues, instead of one in HSA.

The studies on the interaction of DNA-specific ligands – thiasine dye MB and bis-benzimide compound H33258 indicate that, particularly, MB, which binds to DNA by several modes, interacts with albumin as well, though it does not show any specificity to protein. Moreover, in the case of albumin the relative hydrophobic regions become preferable for MB binding, since the main role plays non-specific electrostatic interaction at this ligand binding.

It was revealed that the groove binding compound H33258 to DNA, as MB, interacts with albumin. Meanwhile, the obtained data indicate that these ligands initiate differently-directed conformational changestransformations in protein molecule, which is reflected on structural stability of macromolecule: in the case of H33258 some decrease of wrapping is revealed ( $T_m$  of the complexes decreases), while in the case of MB, vice versa, an increase of wrapping degree of protein dimensional structure takes place ( $T_m$  of the complexes increases).

It is necessary to mention that the interaction of MB and H33258 with DNA is realized both specifically (intercalation mechanism for MB, groove-binding for H33258, which shows a pronounced specificity to AT-pairs of DNA) and non-specifically (electrostatic mechanism). In the case of albumin the certain specific mechanism of binding is not revealed, but it is not excluded that these ligands can bind to the protein through hydrophobic and electrostatic interactions or hydrogen bonds that together result in increasing of protein folding and stabilization of it in relation to temperature, as denaturing factor.

The results, obtained by UV-denaturation, along with spectroscopic studies of albumin complexes, reveal that a loss of  $\alpha$ -helicity of albumin takes place at the interaction with Hoechst. It should be mentioned that, using the method of CD-denaturation, the loss of  $\alpha$ -helicity of albumin was shown to result in increasing of  $T_m$  by 5°C. Meanwhile, the obtained data in the presented work find out the reverse phenomenon, since the denaturation temperature of H33258 complexes with albumin decreases. Based on the fact that a hypsochromic shift appears in the differential spectra of these complexes, we assume that the partial loss of  $\alpha$ -helicity of albumin leads to destabilization of protein structure, i.e. deviation of three-dimensional structure of protein.

The obtained data also revealed that H33258 forms hydrogen bonds with albumin, as well as binds due to van-der-Vaals, but MB – electrostatic interactions. Though, it was revealed that the binding of both H33258 and MB to albumin is conditioned by enthalpy-

entropy compensation mechanism, which is indicated by negative value of Gibbs free energy change.

The carried out studies and the obtained data allow to conclude that albumin in blood plays the main role in deponation as well as transportation of various ligands up to the target. From this point of view, the results of the given work can elucidate the possible mechanisms of delivery of different drugs, as well as biological compounds to their targets.

These data are important from the point of view that they can lie at the basis of design and screening of new drug compounds, as well as in testing of these compounds for the binding to albumin, their deponation by this protein and their effectiveness change in vivo systems.