

УДК 577.323

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Н.А. Гладковская

ИРЭ НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085

e-mail: glad@ire.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 сентября 2007 г.

В статье приведен обзор литературных данных, посвященный описанию структурных и термодинамических параметров связывания в системах лиганды – ДНК. Рассмотрены механизмы связывания для лигандов, интеркалирующих в молекулу ДНК и располагающихся в малой бороздке. Обсуждаются новые подходы к определению различных типов связывания лигандов с помощью термодинамических значений ΔG , ΔH , ΔS .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лиганды, ДНК, способы связывания, термодинамика связывания.

Исследования взаимодействий малых молекул (лигандов) с нуклеиновыми кислотами вызывают значительный интерес в связи с созданием новых лекарственных препаратов. Следует отметить, что для большой группы лекарственных препаратов образование комплексов с ДНК прямо коррелирует с их биологической активностью. Поэтому, чтобы добиться максимальной эффективности действия уже существующих лекарств, а так же для создания новых препаратов, важно уметь на молекулярном уровне охарактеризовать взаимодействие лекарство – нуклеиновая кислота, включая распознавание последовательностей, структурные особенности и термодинамику связывания.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК.

Многие малые молекулы, которые взаимодействуют с ДНК нековалентно, образуют комплексы с «сильными» и «слабыми» типами связывания. К «сильным» типам связывания относят интеркаляцию лигандов в двойную спираль ДНК и комплексы, образованные путем расположения лигандов в малой бороздке ДНК (бороздочники).

Интеркаляция лигандов в ДНК. При интеркаляции в ДНК различных малых молекул расстояние между соседними парами оснований увеличивается от 3,4 Å до 6,8 Å [2]. В работах [3,4] было показано, что взаимодействие многофункциональных интеркалирующих лигандов с двойной спиралью ДНК приводит к удлинению дуплексов. Раскручивание двойной спирали ДНК в месте интеркаляции происходит с учетом геометрии образуемого комплекса ДНК - лиганд. Такое локальное раскручивание приводит к структурным изменениям всей матрицы ДНК [1], в том числе изменяет ее третичную структуру.

Существует целый ряд молекул - интеркаляторов, классифицируемых согласно структуре хромофора. Среди первых лигандов, для которых изучалось взаимодействие с ДНК, были такие классические интеркаляторы, как этидиум бромид, акридиновый оранжевый и профлавин (рис. 1) [5].

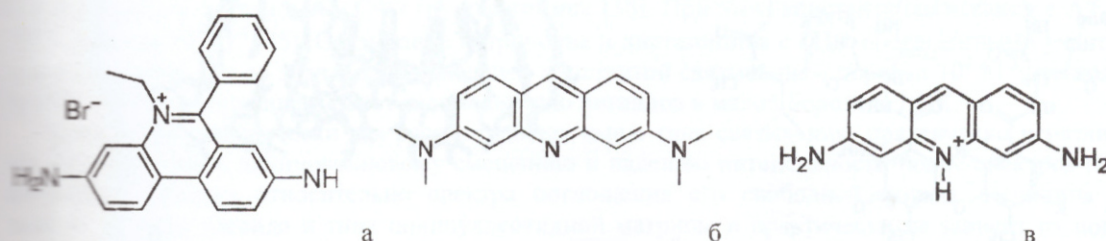


Рис. 1. Структурные формулы этидиума бромида (а), акридинового оранжевого (б), профлавина (в).

Как было отмечено [6], для В-формы ДНК нормальный поворот (twist) пар оснований за счет стэкинга равен 36° . Интеркаляция этидиума бромидом приводит к уменьшению twist с 36° до 10° , то есть происходит "раскручивание" двойной спирали на 26° [7]. Для сравнения, профлавин и акридины при интеркаляции раскручивают В-форму ДНК приблизительно на 17° [8-10].

Антрациклины (рис.2) формируют иную интеркационную геометрию. Адриамицин раскручивает спираль в месте связывания на 11° [11], а дауномицин – приблизительно на 15° [12]. Было показано также, что антрациклины могут быть мощными ингибиторами синтеза ДНК и РНК, и являются в настоящее время наиболее широко используемыми химиотерапевтическими препаратами в борьбе с разнообразными опухолями и лейкемией [13].

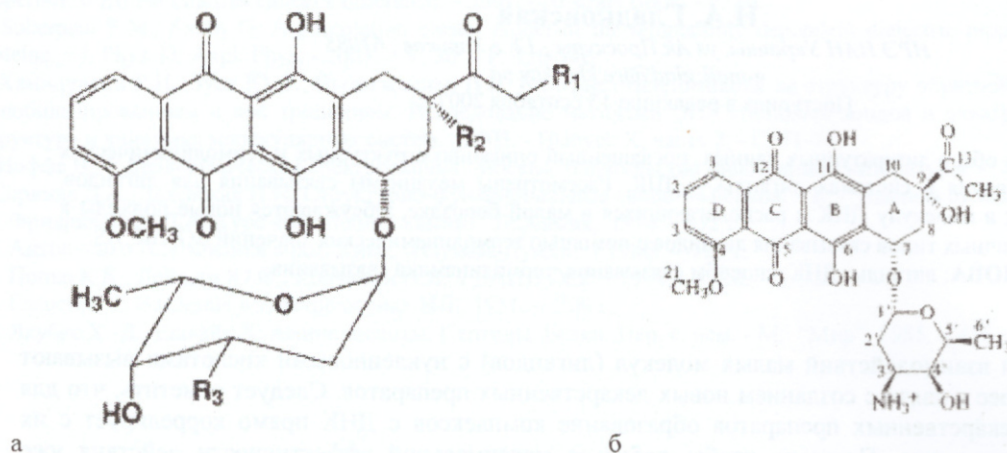


Рис.2. Структурные формулы антрациклиновых антибиотиков: для дауномицина ($R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=NH_2$) и для адриамицина ($R_1=OH$, $R_2=OH$, $R_3=NH_2$) (а), схематические указания колец (А-Д) и атомов дауномицина (б).

Адриамицин и дауномицин интеркалируют в ГЦ – пары молекул ДНК (рис. 3), при этом активные группы "А" кольца (рис.2) располагаются в малой бороздке, и являются акцепторами при образовании водородных связей [14]. "D" кольцо лигандов располагается в большой бороздке ДНК [15]. Специфичность связывания антрациклинов обусловлена формированием водородных связей и выгодным стереохимическим размещением сахара лигандов в малой бороздке ДНК [16]. Ключевым в определении специфичности связывания дауномицина является образование водородных связей между атомами O₉ гидроксила и атомами N₂ и N₃ гуанина, а также водородной связи N₃ амино группы сахара с O₂ атомом тимина [17,18]. Для дауномицина отсутствие гидроксильной группы при C₉ на правой стороне "А" кольца (рис.2) приводит к потере противоопухолевой активности [19].



Рис.3. Интеркаляция дауномицина в гексануклеотид (комплекс 2:1) [19].

Также широко исследуется взаимодействие с полинуклеотидами противоопухолевого антибиотика актиномицина D (рис.4).

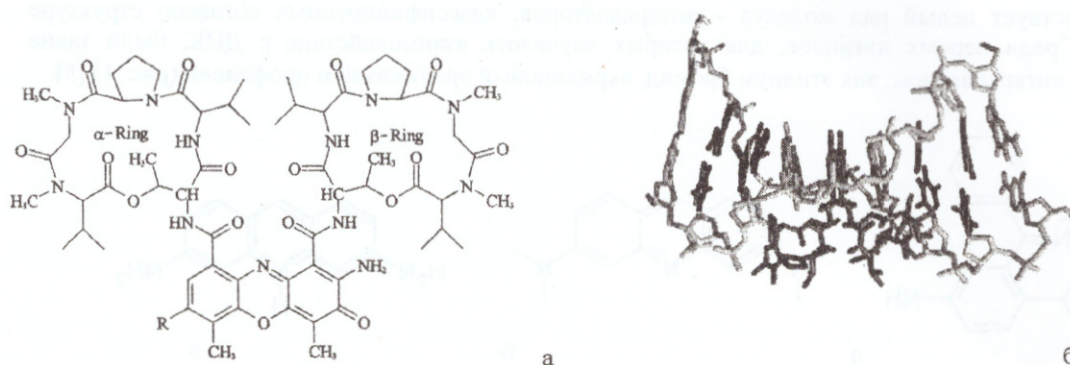


Рис.4. Структурная формула актиномицина D (а), интеркаляция актиномицина D в двойную спираль ДНК (б) [20].

Анализ взаимодействия биологически активных лигандов с нуклеиновыми кислотами

Ранние исследования комплексообразования актиномицина D с ДНК показали [21-24], что этот лиганд связывается с двойной спиралью ДНК с константой связывания $K = (1 - 5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Характеристика кристаллической структуры актиномицина D в комплексе с ДНК была впервые получена Собеллем и др., которые предложили интеркаляционную модель связывания, посредством встраивания хромофора актиномицина D между ГЦ- парами. При этом циклические пентапептидные боковые цепочки формируют водородные связи через кислород карбонила остатка треонина с 2-амино группой гуанина [25,26]. Позже ГЦ- специфичность связывания актиномицина D с ДНК была показана и другими методами [27-30].

Размещение лигандов в малой бороздке ДНК. Второй способ «сильного» связывания – размещение биологически активных лигандов в малой бороздке ДНК. Лиганды, связывающиеся с ДНК таким способом, обычно состоят из нескольких ароматических колец (например, бензольного и пиррольного), связи между которыми имеют торсионную свободу [31]. Для таких лекарственных препаратов типична структура молекул в форме "полумесяца" - Hoechst 33258, нетропсин, дистамицин и DAPI (рис.5) [32-34], то есть они стерически приспособлены к связыванию в малой бороздке ДНК (рис.6). Лиганды, связывающиеся в малой бороздке, не вызывают существенных структурных изменений в молекуле ДНК.

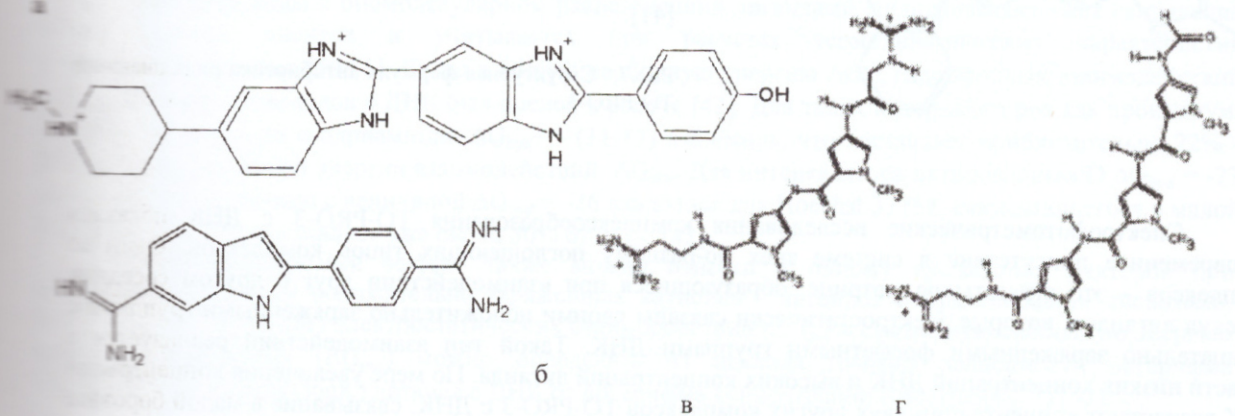


Рис.5. Структурные формулы Hoechst 33258 (а) DAPI (б), нетропсина (в) и дистамицина (г).

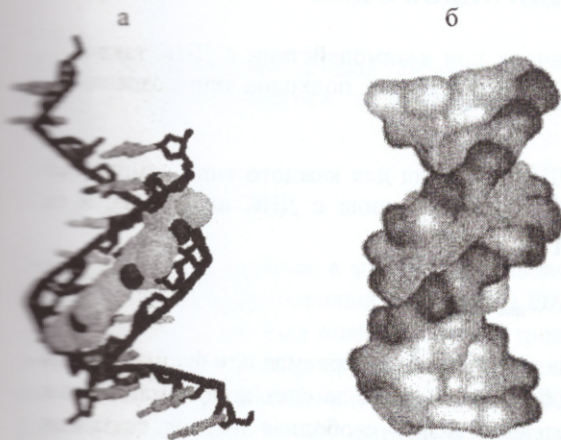


Рис.6. Размещение в малой бороздке ДНК молекулы дистамицина (а) и нетропсина (б) [20].

Связывание лигандов с ДНК в малой бороздке часто носит АТ- специфичный характер и обусловлено образованием водородных связей между полярными группами лигандов и функциональными группами малой бороздки. В АТ-обогащенных последовательностях этими функциональными группами являются N_3 атом аденина и O_2 атом $C=O$ группы тимина [35,36]. Так, например, каждая карбоксамидная единица молекул нетропсина и дистамицина образует две водородные связи с N_3 атомом аденина и атомом O_2 $C=O$ группы тимина [36]. При этом константа связывания с АТ – сайтами ДНК порядка 10^7 M^{-1} [35]. Связывание нетропсина и дистамицина с ГЦ – обогащенными участками ДНК также возможно, но со значительно меньшей константой связывания - порядка 10^4 M^{-1} , поскольку NH_2 - группа молекулы гуанина мешает расположению лигандов в малой бороздке ДНК.

Спектрофотометрически два рассмотренных выше типа связывания практически неразличимы, так как оба приводят к длинноволновому смещению и падению интенсивности полос спектров поглощения связанного лиганда относительно спектра поглощения его свободной формы. Величина смещения зависит от типа лиганда и типа полинуклеотидной матрицы и практически не зависит от ионной силы раствора [37].

Наряду с сильными типами связывания лигандов с полинуклеотидами в смесях с низкими концентрациями НК наблюдается так называемое «слабое» взаимодействие. Обычно такой тип связывания предполагает электростатические взаимодействия положительно заряженных катионов лиганда с отрицательно заряженными группами на полимерной матрице. В процессе адсорбции лигандов на поверхности полимеров значительную роль играют гидрофобные взаимодействия, связанные с переходом лиганда из раствора в связанное состояние и образованием стопочных агрегатов. Дополнительная стабилизация стопочных структур происходит за счет π -электронных взаимодействий плоских ароматических колец лиганда. Это приводит к значительным изменениям их спектра поглощения. Для многих лигандов, содержащих плоские хромофорные группы, такое взаимодействие с полимерными матрицами приводит к коротковолновому смещению спектра поглощения («метахромазии») [38].

Большинство биологически активных веществ, в том числе и выше перечисленные интеркаляторы и бороздочники, могут образовывать на матрице ДНК одновременно несколько типов комплексов [39,40], что усложняет анализ процесса связывания. Примером такого мультимодального взаимодействия лиганда с ДНК может служить также антибиотик ряда цианинов TO-PRO-3 (рис.7) [41].

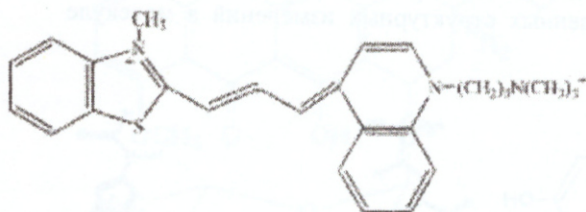


Рис.7. Структурная формула антибиотика ряда цианинов TO-PRO-3.

Спектрофотометрические исследования комплексообразования TO-PRO-3 с ДНК показали одновременное присутствие в системе трех по-разному поглощающих типов комплексов. Один из комплексов – это агрегаты на матрице, образующиеся при взаимодействии друг с другом соседних молекул лигандов, которые электростатически связаны своими положительно заряженными группами с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Такой тип взаимодействий реализуется в области низких концентраций ДНК и высоких концентраций лиганда. По мере увеличения концентрации ДНК возрастают концентрации двух других комплексов TO-PRO-3 с ДНК: связывание в малой бороздке и интеркаляция лиганда [41].

ТЕРМОДИНАМИКА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК

Термодинамические характеристики различных лигандов при взаимодействии с ДНК также, наравне со структурными особенностями, используется в развитии новых подходов при создании лекарственных препаратов.

В полное изменение свободной энергии в системе ДНК – лиганд для каждого типа комплексов вносят вклады несколько процессов. Свободная энергия связывания лиганда с ДНК аддитивна, и ее можно записать как сумму вкладов от нескольких процессов [42]:

$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{I+T}} + \Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{pe}} + \Delta G_{\text{mol}} \quad (1)$$

где ΔG_{obs} – экспериментально определяемая свободная энергия связывания, измеряемая при формировании каждого из комплексов ДНК – лиганд. ΔG_{conf} – вклад в свободную энергию за счет конформационных изменений молекул ДНК и лиганда после формирования комплекса; $\Delta G_{\text{I+T}}$ – свободная энергия, связанная с уменьшением вращательных и колебательных степеней свободы системы; ΔG_{hyd} – свободная энергия гидрофобных взаимодействий; ΔG_{pe} – вклад за счет полиэлектролитных взаимодействий; ΔG_{mol} – вклад в свободную энергию за счет формирования нековалентных молекулярных взаимодействий между лигандами и основаниями ДНК.

Свободная энергия ΔG_{obs} связана с соответствующей равновесной константой образования комплекса K уравнением Гиббса:

$$\Delta G_{\text{obs}}^{\circ} = -RT \ln K \quad (2)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура ($^{\circ}\text{K}$).

Одним из основных вкладов в изменение свободной энергии системы лиганд - ДНК при связывании (ΔG_{obs}) является вклад от гидрофобных взаимодействий (ΔG_{hyd}). Классическое понимание гидрофобных взаимодействий состоит в том, что неполярные группы растворенных веществ при связывании друг с другом минимизируют контакты с растворителем. Гидрофобные взаимодействия, как правило, характеризуются малыми изменениями энтальпии и большими положительными изменениями энтропии [43]. Это можно объяснить, рассмотрев поведение молекул воды и неполярного вещества. Для стабилизации водородных связей молекулы воды выстраиваются определенным образом вокруг неполярного вещества. В таком "слое" (непосредственном окружении гидрофобного вещества) молекулы воды образуют между собой более прочные водородные связи, чем с остальной "объемной" водой [44]. Это не вызывает больших изменений в энтальпии, но при упорядочении системы приводит к уменьшению энтропии. Термодинамика гидрофобных взаимодействий, таким образом, объясняет увеличение энтропии при связывании двух гидрофобных веществ за счет освобождения их водного окружения. Связанные молекулы воды возвращаются к "объемной" воде, формируя в ней обычные, более слабые связи. Влияние молекул воды, расположенных на поверхности связывающихся лиганда и макромолекул, на термодинамику взаимодействий позволили оценить их использование для дизайна новых лекарственных препаратов [45-49].

Важность воды в биомолекулярном распознавании лигандами специфических мест связывания теперь широко оценена и учитывается при расчетах термодинамических характеристик комплексообразования [50,51]. Вклад в общую свободную энергию ΔG_{obs} гидрофобных взаимодействий (ΔG_{hyd}) некоторых лигандов с ДНК был оценен в работе [42]. Для таких интеркаляторов как пропидиум, этидиум, дауномицин и адриамицин $\Delta G_{\text{hyd}} = - (11-13)$ ккал/моль, что составляет приблизительно 22% - 25% от значения общей энергии взаимодействий ΔG_{obs} . Для интеркалятора актиномицина D $\Delta G_{\text{hyd}} = -27$ ккал/моль, что сравнимо с величиной $\Delta G_{\text{hyd}} = -26$ ккал/моль для Hoechst 33258, связывающегося в малой бороздке ДНК, что составляет уже около 50% от ΔG_{obs} [42].

Полиэлектrolитный эффект также можно отнести к одному из важных факторов при комплексообразовании положительно заряженных катионов - лигандов с нуклеиновыми кислотами. Было показано, что вклад электростатических взаимодействий (ΔG_{pe}) в суммарную свободную энергию комплексообразования (ΔG_{obs}) можно определять из наклона графика зависимости логарифма константы связывания ($\log K$) лиганда с ДНК от логарифма концентрации соли ($\log [C_M^+]$) [52]:

$$\Delta G_{\text{pe}} = \frac{\partial \log K}{\partial \log [M^+]} RT \ln [M^+], \quad (3)$$

где R - универсальная газовая постоянная, а T - абсолютная температура в градусах Кельвина. Заряд лиганда, связывающегося с полиэлектrolитной матрицей, можно определять из следующего выражения:

$$\partial \ln K / \partial \ln [M^+] = Z \psi, \quad (4)$$

где Z - это заряд лиганда, а ψ - доля противоионов, связанная с каждым фосфатом молекулы ДНК. Было показано, что для двуспиральной молекулы ДНК $\psi = 0,88$ [92]. В растворе 0,2 M NaCl по уравнению (3) для некоторых лигандов был оценен полиэлектrolитный вклад в общую энергию взаимодействий [42]. Для этидиума величина ΔG_{pe} составила -1,3 ккал/моль (около 4% от ΔG_{obs}), для пропидиума $\Delta G_{\text{pe}} = -2,4$ ккал/моль, для адриамицина и дауномицина $\Delta G_{\text{pe}} \approx -1$ ккал/моль, актиномицина D $\Delta G_{\text{pe}} = -0,5$ ккал/моль, а для Hoechst 33258 - (-2) ккал/моль (около 3% от ΔG_{obs}) [42]. При взаимодействии положительно заряженных лигандов с ДНК эффект экранирования отрицательно заряженных групп НК возрастает и уменьшаются силы отталкивания между отрицательно заряженными группами фосфатов двух нитей ДНК. Таким образом, в присутствии катионов - лигандов увеличивается стабильность структуры комплексов НК, в том числе и ДНК [53].

Также существенным при взаимодействиях в биологических системах является формирование водородных связей. Однако для того, чтобы образовались водородные связи между макромолекулой и лигандом, в тех же местах связывания должны быть разрушены водородные связи между макромолекулой и водой, а также между лигандом и водой. Поэтому водородные связи дают относительно малый суммарный вклад в термодинамику связывания [54]. Энергия отдельной водородной связи оценивается приблизительно в 5 ккал/моль [44], но благодаря природе обмена водородных связей вклад каждой из них в ΔG_{obs} намного меньше.

Конформационные изменения в молекулах ДНК, вызванные лигандом, могут способствовать правильной ориентации активных групп в местах связывания, облегчая дальнейший процесс связывания лигандов с ДНК [55]. Конформационные взаимодействия дают более весомый вклад для комплексов по типу интеркаляции. При интеркаляции, например, этидиума бромида в двойную спираль ДНК вклад конформационных взаимодействий ΔG_{conf} составляет около +3 ккал/моль [56], а для Hoechst 33258, связывающегося в малой бороздке ДНК, $-\Delta G_{\text{conf}} \approx 0$ [42].

Энтальпийно-энтропийная компенсация. Связывание лигандов с ДНК может быть описано в терминах изменения свободной энергии уравнением:

$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta H - T\Delta S, \quad (5)$$

где ΔH и ΔS – изменения энтальпии и энтропии системы при формировании комплекса между лигандом и ДНК. Термодинамические исследования Бреслауэра и др. [5] показали, что можно неверно описывать механизмы связывания лиганда с ДНК, если сравнивать только изменения свободных энергий при связывании (ΔG_{obs}). Это объясняется тем, что для комплексов разного типа изменения свободной энергии (ΔG_{obs}) могут иметь близкие значения. Однако молекулярные механизмы связывания при этом могут существенно различаться за счет энтропийно - энтальпийной компенсации (изменение ΔH относительно ΔS) [5]. Схематическая диаграмма для различных молекулярных механизмов взаимодействия в системах лиганд – макромолекула приведена на рис. 8 [57].

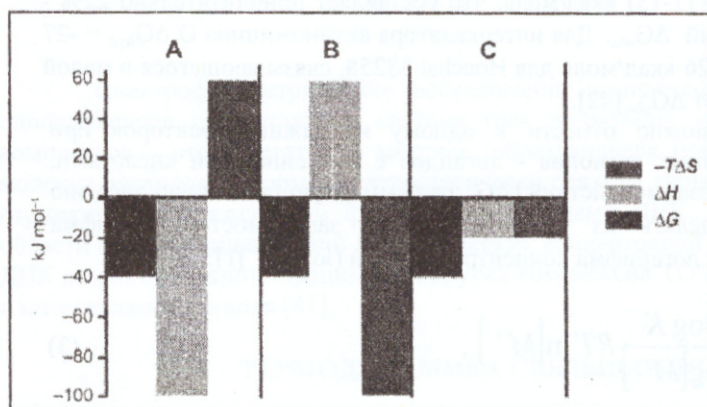


Рис.8. Схематическая диаграмма для различных молекулярных механизмов взаимодействия в системах лиганд – макромолекула: (А) – преобладание водородных связей и конформационных изменений, (В) – связывание происходит благодаря гидрофобным взаимодействиям, (С) – связывание происходит благодаря образованию водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

Так для одного и того же суммарного значения ΔG_{obs} по схеме А благоприятный вклад в стабилизацию комплекса вносит большое отрицательное значение энтальпии, и основными стабилизирующими силами являются водородные и ван дер Ваальсовы взаимодействия. Для схемы В преобладающими являются гидрофобные взаимодействия, а для реакций, протекающих по схеме С - водородные связи и гидрофобные взаимодействия.

Суммарное изменение энтальпии (ΔH) в случае обратимости и равновесности формирования комплекса состоит из многих вкладов ΔH_i , которые определяются ван дер Ваальсовыми взаимодействиями, водородными связями и ионными взаимодействиями. Вклад в энтальпию связывания отрицателен (благоприятен), когда связи образуются и положителен (неблагоприятен), когда связи разрушаются.

Изменение энтропии (ΔS) системы отражает степень(и) свободы и выражается в изменениях упорядочения растворяющихся молекул и/или противоионов, а так же в изменениях их конформаций и гидратного окружения при образовании комплексов. Формирование комплексов в системах лиганд - ДНК приводит к потере колебательных и вращательных степеней свободы [42], поскольку до образования комплекса состояние каждого из этих двух компонентов описывалось тремя колебательными и тремя вращательными степенями свободы. После образования комплекса два набора степеней свободы заменяются на три колебательные и три вращательные степени свободы комплекса, общие для двух молекул. Это приводит к существенной энтропийной потере и неблагоприятному вкладу в свободную энергию системы:

$$\Delta G_{\text{itr}} = T\Delta S_{\text{itr}},$$

Анализ взаимодействия биологически активных лигандов с нуклеиновыми кислотами

где T - абсолютная температура (К), и ΔS_{int} - энтропийная потеря колебательных и вращательных свобод. В этом случае, при взаимодействии компонентов можно ожидать отрицательного изменения энтропии из-за потери степеней свободы реагентов. Однако, в случае мультимодального связывания лигандов с ДНК, суммарная величина изменения энтропии ΔS может стать положительной, например, из-за эффектов при растворении реагирующих веществ.

Среднее значение энтропийной потери было теоретически оценено Споларом и Рекордом [58] и составило величину приблизительно равную $\Delta S = 50 \pm 10$ е.е. Это значение хорошо согласуется с данными, получаемыми по уравнению Сакур - Тетрода для формирования комплекса из двух компонентов [59]. Используя это значение для энтропии связывания, можно рассчитать вклад в свободную энергию: $T\Delta S_{int} = +14.9 (\pm 3.0)$ ккал/моль при 25°C .

Для сравнения термодинамических параметров связывания интеркаляторов и бороздочников, были использованы те опубликованные данные по взаимодействию лиганды - ДНК [60], для которых выполнялись следующие условия: (1) - энтальпия должна быть определена из калориметрических измерений; (2) - константа связывания должна быть рассчитана из независимого эксперимента; (3) - необходимо сравнивать данные при одинаковых условиях эксперимента: ионной силы раствора, температуры и pH. Исходя из этих критериев, удалось получить данные для некоторых бороздочников и интеркаляторов (25°C , pH 7, 0.2M NaCl) [32,42,61-70]. Выяснилось, что для бороздочников, соотношение $-T\Delta S/\Delta G$ изменяется в пределах от 0.33 до 1.85. Исключение составляет только комплекс ДНК - дистамицин. Для интеркаляторов соотношение $\Delta H/\Delta G$ изменяется в пределах от 0.83 до 1.97. При интеркаляции тенденция нарушается только при образовании комплекса ДНК - актиномицин.

Таблица.1
Термодинамические параметры связывания в системах ДНК - лиганд, рассчитанные различными методами при 25°C (данные получены в работах: а - [63], б - [32], в - [42])

	ΔG ккал/моль	ΔH ккал/моль	$T\Delta S$ ккал/моль	$-T\Delta S/\Delta G$
бороздочники				
Ноеchst 33258 ^а	-7,7	+4,4	+12,1	1,57
Нетропсин ^б	-8,7	-5,8	+2,9	0,33
дистамицин ^б	-10,1	-12,3	-2,2	-0,21
Беренил ^б	-8,0	+0,6	+8,6	1,08
интеркаляторы				$\Delta H/\Delta G$
даунорубицин ^б	-7,9	-9,0	+1,1	1,14
доксорубицин ^б	-8,9	-7,4	+1,5	0,83
этидиум ^б	-6,7	-9,0	-2,3	1,34
пропидиум ^б	-7,5	-6,8	+0,7	0,91
актиномицин ^б	-8,5	-2,7	+5,8	0,32

Возможно, различия в термодинамических величинах, наблюдаемых при связывании бороздочников и интеркаляторов, зависят от некоторых особенностей каждого типа взаимодействий. Во-первых, имеются два энтропийных вклада, которые должны быть свойственны этим двум типам реакций. Имеется одинаковый энтропийный проигрыш при формировании биомолекулярного комплекса из-за потери колебательных и вращательных степеней свободы [42,58,71,72]. Во-вторых, для взаимодействия заряженных лигандов с ДНК, независимо от способа связывания, имеется благоприятный общий энтропийный вклад от полиэлектролитного эффекта [73,52]. Величина благоприятного полиэлектролитного вклада зависит от заряда лиганда, и изменяется в интервале от 1 до 4 ккал/моль. [74]. Оба этих вклада должны быть подобны для связывания бороздочников и интеркаляторов, что не может объяснить различия в термодинамических величинах. Интеркаляция сопровождается удлинением и раскручиванием двойной спирали ДНК [75]. При образовании комплексов по типу интеркаляции

изменение свободной энергии обусловлено во многом структурными изменениями самой молекулы НК. Жесткость структуры ДНК должна привести к неблагоприятному изменению энтропии. Это - наиболее вероятное объяснение, связанное с изменением термодинамических величин при интеркаляции. Упрощенное объяснение более благоприятного энтропийного вклада, наблюдаемого при связывании бороздочников, состоит в том, что происходит высвобождение связанной воды после формирования комплекса [76]. В то же время гипотеза осмотического напряжения не позволяет дать такое простое объяснение [77,78]. Кроме того, термодинамические параметры комплексообразования при расположении лиганда в малой бороздке ДНК существенно зависят и от последовательности оснований в молекулах НК [34].

Анализ показал интересную тенденцию: связывание в бороздке является энтропийно зависимым, а интеркаляция – энтальпийно зависимой. Расширение термодинамической базы данных для лигандов позволит объяснить молекулярные различия для двух типов связывания [60].

В последнее время достигнут существенный прогресс в исследовании структурных и динамических свойств комплексов ДНК – лиганд. Для выявления корреляции между биологической активностью и физическими свойствами тех или иных препаратов, между их геометрией и термодинамическими параметрами взаимодействия применяется весь комплекс физических и биохимических методов исследования. Важной задачей остается также изучение влияния структурных модификаций молекул на физические, химические и биологические свойства комплексов ДНК – лекарственный препарат. Все это обеспечит понимание основных требований, необходимых для синтеза более эффективных химиотерапевтических агентов второго и третьего поколений, которые могут быть использованы при лечении многих типов заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graves D. E., Velea L. M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids// *Curr. Org. Chem.* - 2000. -V. 4. - P. 915 - 929.
2. Di Marco A., Arcamone F. DNA complexing antibiotics: daunomycin, adriamycin and their derivatives//*Arzneimittelforschung.(Drug Res.)*. - 1975.- V. 25(3). - P. 368-374.
3. Tuite E, Norden B. Intercalative interactions of ethidium dyes with triplex structures// *Bioorg. Med. Chem.* - 1995. - V. 3(6). - P. 701-711.
4. Wang A.H.G., Ughetto G.J., Quigley A.R., Rich A. Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution// *Biochemistry*. - 1987. - V. 26. - P. 1152-1163.
5. Breslauer K.J., Remeta D.P., Chou W.-Y., Ferrante R., Curry J., Zaunczkowski D., Snyder J.G., Marky L.A. Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies (thermodynamic driving forces/drug-induced changes/probes of DNA conformation)// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1987. -Vol. 84. - P. 8922-8926.
6. Martin C. *Macromolecular Modeling*// <http://www.chem.umass.edu/~cmartin/Courses/MCB642>.
7. Vologodskii A. Exploiting circular DNA// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1998.- Vol. 95. - P. 4092-4093.
8. Waring M. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation// *J Mol Biol.* -1970. - V. 54(2). - P. 247-279.
9. Wang J.C. The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients// *J. Mol. Biol.* - 1974. - V. 89. - P. 783- 801.
10. Neidle S., Abraham Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acids//*CRC Crit. Rev. Biochem.* - 1984. -V. 17. - P. 73-121.
11. Manfait M., Alix A., Jardillier J.-C., Theophanides T. Interaction of adriamycin with DNA as studied by resonance Raman spectroscopy// *Nucleic acids Res.* -1982. - Vol. 10. - N. 3. - P. 3803-3816.
12. Fritzsche H., Triebel H., Chaires J.B., Dattagupta N., Crothers D.M. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: geometry of intercalation of iremycin and daunomycin// *Biochemistry*. - 1982.- V. 21(17). - V. 3940-3946.
13. Arcamone F. *Doxorubicin Anticancer Antibiotics*. - Medicinal Chemistry: A Series of Monographs. - New York: Academic Press, 1981. - V. 17.
14. Chen Y.Z., Szabo A., Schroeter D.F., Powell J.W., Lee S.A., Prohofsky E.W. Effect of drug-binding-induced deformation on the vibrational spectrum of a DNA-daunomycin complex// *Phys. Rev.* - V. 55. - № 6. - P. 7414-7423.
15. Schuerman G. S., Van Meervelt L. Conformational flexibility of the DNA backbone//*J. Am. Chem. Soc.* - 2000. - V. 122. - P. 232-240.
16. Pehler J., Brecht A., Gaudlitz G., Zerlin M., Maul C., Triericke R., Grabley S. Label-free monitoring of DNA-ligand interaction// *Analytical Biochemistry*. - 1997. - V. 249. - P. 94-102.
17. Smith C.K., Davies G.J., Dodson E.J., Moore M.H. DNA-nogalamycin interactions: the crystal structure of d(TGATCA) complexed with nogalamycin// *Biochemistry*. - 1995. -V. 34. - P. 415-425.

18. Chaires J.B., Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewlorka T., Priebe W. Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA// *Biochemistry*. - 1996. - V. 35. - P. 2047-2053.
19. Frederick C.A., Williams L.D., Ughetto G., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang A.H. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin// *Biochemistry*. - 1990. - V. 29(10). - P. 2538-2549.
20. MacKerell M. Drugs targeting DNA and RNA// www.pharmacy.umaryland.edu/courses/PHAR53/lectures/dna.pdf.
21. Gellert M., Smith C.E., Neville D., Felsenfeld G. Actinomycin binding to DNA: mechanisms and specificity// *J. Mol. Biol.* - 1965. - V. 11. - P. 445-457.
22. Muller W., Crothers D.M. Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA// *J. Mol. Biol.* - 1968. - V. 35. - P. 251-290.
23. Bailey S.A., Graves D.E., Rill R., Marsch G. Influence of DNA base sequence on the binding energetics of actinomycin D// *Biochemistry*. - 1993. - V. 32. - P. 5881-5887.
24. Wells R.D., Larson J.E. Studies on the binding of actinomycin D to DNA and DNA model polymers// *J. Mol. Biol.* - 1970. - V. 49. - P. 319-342.
25. Sobell H. M. How actinomycin binds to DNA// *Sci. American*. - 1974. - V. 231. - P. 82-91.
26. Sobell H.M., Jain S.C. Stereochemistry of actinomycin binding to DNA II. Detailed molecular model of actinomycin-DNA complex and its implication// *J. Mol. Biol.* - 1972. - V. 68. - P. 21-34.
27. White R.J., Phillips D.R. Sequence-dependent termination of bacteriophage T7 transcription in vitro by DNA-binding drugs// *Biochemistry*. - 1989. - V. 28. - P. 6259-6269.
28. Fox K.R., Waring M.J. Nucleotide sequence binding preferences of nogalamycin investigated by DNase I footprinting// *Biochemistry*. - 1986. - V. 25. - P. 4349-4356.
29. Goodisman J., Rehfuess R., Ward B., Dabrowiak J.C. Site-specific binding constants for actinomycin D on DNA determined from footprinting studies// *Biochemistry*. - 1992. - V. 31. - P. 1046-1058.
30. Rill R.L., Marsch G.A., Graves D.E. Photoaffinity approaches to determining the sequence selectivities of DNA-small molecule interactions: actinomycin D and ethidium// *Nucleic Acids Research*. - 1995. - V. 23. - P. 1252-1259.
31. Thermodynamics of Nucleic Acid-Drug Interactions// www.microcalorimetry.com/files/nucleicacidappnote.pdf
32. Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B. Specific binding of Hoechst 33258 to the d(CGCAATTTGCG)2duplex: Calorimetric and spectroscopic studies// *J. Mol. Biol.* - 1997. - V. 271. - P. 244-257.
33. Dasgupta D., Howard F., Sasisekharan V., Miles H.T. Drug - DNA binding specificity: binding of netropsin and distamycin to Poly(d2NH2A-dT)// *Biopolymers*. - 1990. - Vol. 30. - P. 223 - 227.
34. Bailly C., Chaires J. B. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues// *Bioconjug. Chem.* - 1998. - V. 9. - P. 513-538.
35. Uytterhoeven K., Sponer J., Van Meervel L. Two 1 : 1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG)// *Eur. J. Biochem.* - 2002. - V. 269. - P. 2868-2877.
36. Baliga R., Crothers D.M. On the kinetic of distamycin binding of its target sites on duplex DNA// *PNAS*. - 2000. - V. 97. - № 14. - P. 7814-7818.
37. Ren J., Chaires J.B. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands// *Biochemistry*. - 1999. - V. 38. - P. 16067 - 16075.
38. Теренин. А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. - Л.: Наука, 1967. - 616 с.
39. Barcelo F., Capo D., Portugal J. Thermodynamic characterization of the multiple binding of chartreusin to DNA// *Nucleic Acids Researches*. - 2002. - V. 30. - N 20. - P. 4567-4573.
40. Barcelo F., Ortiz-Lombardia M., Portugal J. Heterogenous DNA binding modes of berenil// *Bioch. Biophys. Acta*. - 2001. - V. 1519. - P. 175 - 184.
41. Sovenyazy K., Bolderon J., Petty J. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of trimetine-bridged cyanine dye with DNA// *Nucleic Acids Researches*. - 2003. - Vol. 31. - N 10. - P. 2561 - 2569.
42. Chaires J.B. Energetics of drug-DNA binding// *Biopolymers*. - 1998. - V. 44. - P. 201-215.
43. Lin Z., Schwarz F.P., Eisenstein E. The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding// *J. Biol. Chem.* - 1994. - V. 270. - P. 1011-1014.
44. Holdgate G.A. Making cool drugs hot. The use of isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics // *Biotechniques*. - 2001. - V. 3. - P. 164-184.
45. Connelly P., Thomson J.A., Fitzgibbon M.J., Bruzzese F.J. Probing hydration contributions to the thermodynamics of ligand binding by proteins. Enthalpy and heat capacity changes of tacrolimus and rapamycin binding to FK506 binding protein in D2O and H2O// *Biochemistry*. - 1993. - V. 32. - P. 5583-5590.
46. Connelly P., Aldape R.A., Bruzzese F.J., Chambers S.P., Fitzgibbon M.J., Fleming M.A., Itoh S., Livingstone D.J., Navia M.A., Thomson J.A., Wilson K.P. Enthalpy of hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1994. - V. 91. - P. 1964-1968.
47. Davies T., Hubbard R.E., Tame J.R.H. Relating structure to thermodynamics: the crystal structures and binding affinity of eight Opp. Apeptide complexes// *Protein Sci.* - 1999. - V. 8. - P. 1432-1444.
48. S. Sleight, Seavers P.R., Wilkinson A.J., Ladbury J.E., Tame J.R. Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to Opp. A. protein// *J. Mol. Biol.* - 1999. - V. 291. - P. 393-415.

49. Tame J., Sleigh S.H., Wilkinson A.J., Ladbury J.E. The role of water in sequence-independent ligand binding by an oligopeptide transporter protein [letter]// *Nat. Struct. Biol.* - 1996. - V. 3. - P. 998-1001.
50. Neto J.R., Colombo M. F. Water regulation of actinomycin-D binding to DNA: The interplay among drug affinity, DNA long-range conformation, and hydration// *Biopolymers.* - 2000. - Vol. 53. - P. 46-59.
51. Sunnerhagen M., Denisov V.P., Venu K., Bonvin A.M.J., Carey J., Halle B., Otting G. Water molecules in DNA recognition I: hydration lifetimes of trp operator DNA in solution measured by NMR spectroscopy// *J. Mol. Biol.* - 1998. - V. 282. - P. 847-858.
52. Record M.T.Jr., Anderson C.F., Lohman T.M. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity// *Quart. Rev. Biophys.* - 1978. - V. 11. - P. 103-178.
53. Bjordnal M.T., Fyngenson D.K. DNA melting in the presence of fluorescent intercalating oxazole yellow dyes measured with a gel-based assay// *Biopolymers.* - 2002. - V.65. - P. 40-44.
54. Fersht A.R. Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2000. - V. 97(4). - P. 1525-1529.
55. Eftink M., Bittonen R. Thermodynamics of interacting biological systems. Biological microcalorimetry. - London: Academic press. - 1980. - P. 343-412.
56. Thermodynamics of nucleic acid-drug interactions// Microcal. LLC.- 2004.- www.microcalopimetry.com.
57. O'Brien R., Haq I. Applications of biocalorimetry: binding, stability and enzyme kinetics. Biocalorimetry 2. (Edited by John E. Ladbury and Michael Doyle.) - John Wiley & Sons, Ltd. - 2004. - 34 p.
58. Spolar R.S., Record M.T.Jr. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA// *Science.* - 1994. - V. 263. - P. 777-784.
59. Amzel L.M. Structure, function, and genetics. Loss of translational entropy in binding, folding and catalysis// *Proteins.* - 1997. -V. 28. - P. 144-149.
60. Chaires J. B. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode// *Archives of Biochemistry and Biophysics.* - 2006. - V. 453. - P. 24-29.
61. Leng F., Priebe W., Chaires J.B. Ultratight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic// *Biochemistry.* - 1998.-V.37.-P. 1743-1753.
62. Portugal J., Cashman D.J., Trent J.O., Ferrer-Miralles N., Przewloka T., Fokt I., Priebe W., Chaires J.B. // A new bisintercalating anthracycline with picomolar DNA binding affinity// *J. Med. Chem.*- 2005.-V. 48.- P. 8209-8219.
63. Haq I. Thermodynamics of drug-DNA interactions// *Arch. Biochem. Biophys.* - 2002.-V. 403. - P. 1-15.
64. Ren J., Jenkins T.C., Chaires J.B. Energetics of DNA intercalation reactions// *Biochemistry.*- 2000.- V.39.-P. 8439-8447.
65. Carrasco C., Vezin H., Wilson W.D., Ren J., Chaires J.B, Bailly C. DNA binding properties of the indolocarbazole antitumor drug NB-506// *Anticancer Drug Des.*- 2001.- V.16.-P. 99-107.
66. Han F., Taulier N., Chalikian T.V. Association of the minor groove binding drug Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)2: volumetric, calorimetric, and spectroscopic characterizations// *Biochemistry.* - 2005.-V. 44.- P. 9785-9794.
67. Haq I., Chowdhry B.Z., Chaires J.B. Singular value decomposition of 3-D DNA melting curves reveals complexity in the melting process// *Eur. Biophys. J.* -1997.-V.26.-P. 419-426.
68. Leng F., Chaires J.B., Waring M.J. Energetics of echinomycin binding to DNA// *Nucleic Acids Research.* - 2003. - Vol. 31. - No. 21. - P. 6191-6197.
69. Mazur S., Tanius F.A., Ding D., Kumar A., Boykin D.W., Simpson I.J., Neidle S., Wilson W.D. A thermodynamic and structural analysis of DNA minor-groove complex formation// *J. Mol. Biol.* -2000.-V.300.-P. 321-337.
70. Qu X., Ren J., Riccelli P.V., Benight A.S., Chaires J.B. Enthalpy/entropy compensation: influence of DNA flanking sequence on the binding of 7-amino actinomycin D to its primary binding site in short DNA duplexes// *Biochemistry.* - 2003.-V.42.-P. 11960-11967.
71. Amzel L.M. Calculation of entropy changes in biological processes: folding, binding, and oligomerization// *Methods Enzymol.* - 2000.-V.323.-P. 167-177.
72. Haq I., Jenkins T.C., Chowdhry B.Z., Ren J., Chaires J.B. Parsing free energies of drug-DNA interactions// *Methods Enzymol.* - 2000.-V.323. -P. 373-405.
73. Manning, G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides// *Quart. Rev. Biophys.* - 1978. -V. 11. - P. 179-246.
74. Chaires J.B. Dissecting the free energy of drug binding to DNA// *Anticancer Drug Des.* - 1996. - V.11.-P. 569-580.
75. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Ignacio Tinoco J. *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions.* University Science Books. Sausalito. California. 2000.
76. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R.E. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 1985.- P.82.-P.1376-1380.
77. Kiser J.R., Monk R.W., Smalls R.L., Petty J.T. Hydration changes in the association of Hoechst 33258 with DNA// *Biochemistry.*- 2005.-V.44. -P.16988-16997.
78. Sidorova N.Y., Rau D.C. The osmotic sensitivity of netropsin analogue binding to DNA// *Biopolymers.*- 1995.-V. 35.- P. 377-384.