

УДК 577.113:577.32

**ИЗМЕНЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ ПРИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ
ЛИГАНДОВ С ДНК (миниобзор)****В.В. Костюков, М.П. Евстигнеев***Севастопольский национальный технический университет,
ул. Университетская, 33, Севастополь, 99053, Украина*

Поступила в редакцию 2 декабря 2011

Принята 16 декабря 2011

В работе проведен аналитический обзор литературных данных об изменениях водной оболочки лиганда и ДНК при комплексообразовании с учетом недавно опубликованных новых результатов по методу СВЧ-диэлектротометрии. Приведены результаты как экспериментальных (СВЧ-диэлектротометрия, волюметрия, осмометрия), так и теоретических (молекулярное моделирование) исследований. Показано, что имеет место принципиальное различие между данными осмометрии, демонстрирующими захват дополнительных молекул воды при связывании лиганда с ДНК, и всеми остальными методами, дающими, наоборот, частичное высвобождение воды. При этом изменения гидратации из СВЧ-диэлектротометрии и молекулярного моделирования хорошо согласуются между собой, однако дают заниженные значения по отношению к волюметрии. Выполненный анализ свидетельствует о необходимости пересмотра методики осмометрии применительно к системам лиганд-ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комплексообразование, лиганд, ДНК, гидратация, вытеснение/захват воды.**ЗМІНА ГІДРАТАЦІЇ ПРИ КОМПЛЕКСООУТВОРЕННІ ЛІГАНДІВ З ДНК (міні-огляд)****В.В. Костюков, М.П. Євстигнєєв***СевНТУ, вул. Університетська, 33, Севастополь, 99053*

В роботі проведено аналітичний огляд літературних даних щодо зміни водної оболонки ліганда і ДНК при комплексоутворенні з урахуванням недавно опублікованих нових результатів за методом НВЧ-діелектротометрії. Наведено результати як експериментальних (НВЧ-діелектротометрії, волюметрії, осмометрії), так і теоретичних (молекулярне моделювання) досліджень. Показано, що має місце принципова відмінність між даними осмометрії, що демонструють захоплення додаткових молекул води при зв'язуванні ліганда з ДНК, і всіма іншими методами, що дають, навпаки, часткове вивільнення води. При цьому зміна гідратації за даними НВЧ-діелектротометрії і молекулярного моделювання добре узгоджуються між собою, проте дають занижені значення по відношенню до волюметрії. Виконаний аналіз свідчить про необхідність перегляду методики осмометрії стосовно до систем ліганд-ДНК.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: комплексоутворення, ліганд, ДНК, гідратація, витіснення / захоплення води.**CHANGE OF HYDRATION ON COMPLEXATION OF THE LIGANDS WITH DNA
(Mini-review)****V.V. Kostjukov, M.P. Evstigneev***Sevastopol National Technical University, Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 99053, Ukraine*

In the present work analytical review of published data on changes of water shell of the ligand and the DNA on complexation with account of recently published new results obtained by the method of microwave dielectrometry, was performed. The results of both experimental (microwave dielectrometry, volumetry, osmometry) and theoretical (molecular modeling) studies are presented. It is shown that there is a fundamental difference between the osmometry, demonstrating the uptake of additional water molecules on ligand binding with DNA, and all other methods, which give, in contrast, partial release of water. At the same time differences in hydration gained from microwave dielectrometry and molecular modeling are in good agreement between each other, however, underestimate hydration in relation to volumetry. The analysis highlights the need for revision of the method of osmometry in application to ligand-DNA systems.

KEY WORDS: complexation, ligand, DNA, hydration, water release/uptake.**ВВЕДЕНИЕ**

Водное окружение играет важную роль при комплексообразовании с ДНК лигандов - белков [1,2], МГВ-лигандов [3-5] и интеркаляторов [6,7]. Согласно литературным данным, эта роль обусловлена тремя основными эффектами. Во-первых, связывание с лигандом разрушает высокоупорядоченное гидратное окружение малого желобка ДНК - «хребет гидратации» [8,9], что является энтропийно выгодным

процессом и способствует комплексообразованию [5]. При этом молекулы воды вытесняются в раствор, следовательно, данный процесс сопровождается значительным гидрофобным вкладом. Во-вторых, молекула воды способна образовывать водородные связи одновременно с ДНК и лигандом (межмолекулярные «водные мостики»), что дополнительно стабилизирует комплекс лиганд-ДНК [5]. В-третьих, вытеснение молекул воды ближайшей гидратной оболочки ДНК и лиганда при связывании сопровождается разрывом водородных связей, поэтому является энергетически невыгодным [5]. Таким образом, результирующее действие данных трех факторов и представляет собой суммарный эффект влияния взаимодействия с водным окружением (гидратации) на термодинамику комплексообразования лигандов с ДНК.

Количественно гидратация характеризуется количеством молекул N в водной оболочке вокруг растворенного вещества. Гидратная оболочка биомолекулы (ДНК или лиганда) состоит из сильно- и слабо связанной воды [5]. Под сильно связанной водой подразумевается ближайшая гидратная оболочка, соединенная с молекулой растворенного вещества Н-связями. Толщина оболочки слабо связанной воды четко не установлена.

Изменение гидратации при комплексообразовании ΔN является основной количественной характеристикой роли водного окружения в данном процессе. Важнейшей особенностью параметра ΔN является возможность его измерения при помощи различных экспериментальных и теоретических подходов, что позволило накопить к настоящему времени достаточно большой объем фактического материала по величине ΔN в различных реакциях комплексообразования лигандов с ДНК. Однако, как было показано в работе [10], существует противоречие между результатами измерения ΔN различными методами (см. ниже). Недавно, для определения ΔN был впервые использован альтернативный метод исследования - сверхвысокочастотная диэлектromетрия (СВЧДМ) [11,12]. Проведем ре-анализ общей проблематики измерения гидратации в системах лиганд-ДНК с учетом данных этого метода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ СВЯЗАННОЙ ВОДЫ

На сегодняшний день для исследования вклада гидратации в реакции комплексообразования лиганд-ДНК применяются экспериментальные (СВЧДМ, волюметрия, осмометрия) и теоретические (молекулярное моделирование (ММ) – молекулярная динамика и Монте-Карло) методы. Отметим, что изменение гидратации может быть также оценено методами пьезогравииметрии и ИК-спектроскопии в тонких пленках при различной относительной влажности [13]. Однако применительно к системам лиганд-ДНК в литературе имеются лишь данные по гидратации при связывании актиноциновых антибиотиков с ДНК с использованием этих методов (см. обзор [13] и ссылки в нем), не предоставляющие численных значений изменения гидратационного индекса при комплексообразовании с ДНК в явном виде, необходимом для проведения анализа в контексте настоящего обзора.

Метод СВЧДМ основан на различии комплексной диэлектрической проницаемости ε^* свободной и связанной воды [11,12]. Определение величины $\varepsilon^* = \varepsilon' - i\varepsilon''$ может быть выполнено с помощью дифференциального метода. Непосредственно измеряются разности $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$ коэффициентов затухания α и фазовых постоянных β воды и изучаемых образцов. Из них на основании известных электродинамических соотношений вычисляются соответствующие разности $\Delta\varepsilon'$ и $\Delta\varepsilon''$. При количественной оценке степени гидратации N полагается, что при используемых малых концентрациях и отсутствии поглощения в СВЧ диапазоне разность $\Delta\varepsilon_i$ является линейной функцией объема биомолекул v и объема связанной воды ω :

$$\Delta \varepsilon_s = pk[(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty^B)\nu + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty^W)\omega], \quad (1)$$

где p – коэффициент пропорциональности, ε_∞^B и ε_∞^W – высокочастотные пределы величины ε' биомолекул (≈ 4) и воды (≈ 5). Из (1) находится ω , а через нее – степень гидратации N .

Метод волнометрии основан на измерении различия удельного объема ΔV_h свободной и связанной с ДНК (и лигандом) воды при приложении гидростатического давления. Согласно [14],

$$\Delta V_h = \sum_i n_{hi}(V_{hi} - V_0), \quad (2)$$

где n_{hi} – количество молекул воды в гидратной оболочке i -й группы молекулы растворенного вещества, V_{hi} и V_0 – парциальные молярные объемы воды в гидратной оболочке и в свободном состоянии, соответственно. Величина ΔV_h может быть измерена как путем гидростатического сжатия, так и ультразвуковым методом.

Метод осмометрии основан на добавлении в водный раствор ДНК и лиганда больших концентраций веществ, понижающих активность воды (осмолитов). При возрастании концентрации осмолита O_s вода, связанная с ДНК и лигандом, испытывает увеличивающееся осмотическое давление, приводящее к их дегидратации. Это, в свою очередь, вызывает снижение сродства лиганда к ДНК (равновесной константы комплексообразования K). Таким образом, имеет место конкуренция между осмолитом и ДНК (лигандом) за связывание с водой. Динамическое равновесие в растворе наступает при условии [15]

$$\frac{d \ln K}{dO_s} = -\frac{\Delta N}{55.6}. \quad (3)$$

При изучении влияния гидратации на комплексообразование методами молекулярного моделирования (ММ) используется явное задание водного окружения. При этом анализируется либо изменение числа молекул воды, образующих Н-связи с растворенным веществом (гидратационный индекс) [6,10,16-18], либо молекул в слое определенной толщины вокруг молекул ДНК и лиганда (комплекса) [13,16,17], либо плотности распределения молекул воды [7].

ОБСУЖДЕНИЕ ДАННЫХ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ

Результаты измерения гидратации при комплексообразовании лигандов с ДНК по литературным данным представлены в таблице 1.

Таблица 1. Изменения гидратации при комплексообразовании лигандов с ДНК.

№	Метод	ДНК	Лиганд	N			ΔN	ссылка
				ДНК	Лиганд	Комплекс		
1.	СВЧДМ	полимерная	CAF	16 ¹⁾ на один нуклеотид	4	16	-4	[11]
2.			PUT		4...5	12...13	-8	
3.			PF		7...8	20	-3...-4	
4.			EB		5	17	-4	[12]
5.			PI		7 ²⁾	18...19	7 ²⁾	
6.	Волно- метрия	d(CGCGAATTCGCG) ₂	HT	x	81	x+21	-55	[14]
7.		poly(dAdT)·poly(dAdT)	NT			x+22	-	[19]
8.		poly(dA)·poly(dT)				x+40		
9.		poly(dT)·poly(dA)·poly(dT)				x+53		
10.		poly(dAdT)poly(dAdT)	EB			x-5.5	-23.5	[20]
11.		poly(dGdC)poly(dGdC)				x	-18	
12.		poly(dIdC)poly(dIdC)			x	-18		
13.	Осмо- метрия	полимерная	EB	-	-	-	+0.25	[21-23]
14.			PI				+6	
15.			PF				+18.0	
16.			DAU				+30	

17.		AMD				+32	
18.		DOX				+35	
19.		DAPI				35	
20.		NT				26	[24]
21.		PM				34	
22.	полимерная	NT	-	-	-	+(50...60)	[25]
23.	полимерная	AMD	-	-	-	-24	[26]
24.	d(CGCGCAATTGCGCG)	HT	-	-	-	60	[27]
25.	d(GCGCACGTGCGC) ₂	DAU	56	11	64	-3	[18]
26.	d(GAAGCTTC) ₂	Act2		10	142	-16	
27.	d(GAAGCTTC) ₂	Act3	148	20	155	-13	
28.	d(GAAGCTTC) ₂	Act4		19	162	-5	
29.	d(GAAGCTTC) ₂	Act5		16	158	-6	
30.	d(CGCGTTAACGCG) ₂	Act2		10	197	-14	[6]
31.	d(CGCGTTAACGCG) ₂	Act3	201	20	212	-9	
32.	d(CGCGTTAACGCG) ₂	Act4		19	211	-9	
33.	d(CGCGTTAACGCG) ₂	Act5		16	213	-4	
34.		AMD		11.8	164	-13.1	
35.		DAU		12.4	173	-5.5	
36.		EB		5.9	169	-2.8	
37.		NOG		10.8	166	-12.6	
38.		NOV		8.8	173	-2.6	
39.		PF	168	6.4	168	-3.3	
40.		TOTA		0.4	161	-7.5	
41.		FAS		1.6	162	-7.4	
42.		PS		4.9	166	-6.7	[28]
43.		TH		4.6	168	-5.0	
44.		EL		2.4	166	-5.0	
45.		BN		8.9	165	-7.7	
46.		DAPI		8.6	164	-8.9	
47.		DB293		9.4	162	-11.3	
48.		DM		12.2	160	-16.4	
49.		DB75	164	7.9	163	-8.6	
50.	d(CGCA ₄ GCG)/ (CGCT ₄ GCG)	HT		7.9	158	-14.1	
51.		NT		13.0	166	-11.2	
52.		PM		7.7	162	-9.4	
53.		PR		8.0	165	-6.8	
54.		SN6999		3.7	156	-11.5	

Примечания: ¹⁾ Получено усреднением по литературе; ²⁾ Гидратацию свободного PI измерить не удалось и-за его плохой растворимости

В таблице представлены следующие лиганды:

- ароматические соединения, демонстрирующие преимущественно интеркаляционный способ связывания с ДНК: профлавин (PF), бромистый этидий (EB), йодистый пропидий (PI), дауномицин (DAU), актиномицин D (AMD) и его синтетические производные – актиноцины (Act2...5), доксорубин (DOX), ногаламицин (NOG), новантрон (NOV), триоксатриантулен (TOTA), фаскаплизин (FAS), феносафранин (PS), эллиптицин (EL), тионин (TH), кофеин (CAF);

- лиганды, связывающиеся в малую канавку ДНК (Minor Groove Binders, далее по тексту - MGB) путресцин (PUT), Hoechst33258 (HT), нетропсин (NT), DAPI, пентамидин (PM), беренил (BN), DB293, DB75, пропамидин (PR), SN6999.

Изменение гидратации вычислялось как разность гидратаций комплекса и ДНК и лиганда в их свободных состояниях:

$$\Delta N = N(\text{Комплекс}) - N(\text{Лиганд}) - N(\text{ДНК}). \quad (4)$$

Прежде всего отметим, что данные СВЧДМ дают отрицательное значение $\Delta N < 0$, что соответствует вытеснению части воды гидратных оболочек ДНК и лиганда при комплексообразовании. Результаты СВЧДМ (как N , так и ΔN), хорошо согласуются с

данными ММ по РF (строки 3, 39) и ЕВ (строки 4, 36). Для ЕВ расхождение ΔN по модулю не такое значительное, но их знаки также различны (там же, строки 4 и 14). Отметим, что свободная ДНК, согласно данным СВЧДМ, может быть гидратирована как сильнее, так и слабее комплекса (см. формулу (5) и обсуждение ниже).

Метод волюметрии также дает вытеснение воды при комплексообразовании $\Delta N < 0$, однако в среднем значительно большее по абсолютной величине, чем СВЧДМ (строки 4 и 10, 11, 12). При этом для МGB-лигандов комплекс оказывается гидратирован значительно сильнее, чем свободная ДНК (на $\sim 20 \dots 50$ молекул, строки 6-9), а в случае интеркаляторов – так же (строки 11, 12) или слабее (строка 10).

Методы ММ дают высвобождение воды $\Delta N < 0$, причем результаты моделирования, выполненные различными авторами, количественно достаточно неплохо согласуются между собой для одностипных лигандов. Также, как упоминалось выше, имеет место хорошее соответствие между данными ММ и СВЧДМ. Свободная ДНК, согласно данным ММ и СВЧДМ, может быть гидратирована как сильнее, так и слабее комплекса. При этом результаты ММ для НТ (строки 6 и 50) и ЕВ (строки 10-12 и 36) качественно соответствуют данным волюметрии ($\Delta N < 0$), давая в среднем сильно заниженные значения по отношению к последней.

Среди всех рассмотренных выше методов осмометрия является единственным методом, который в большинстве случаев демонстрирует захват воды при комплексообразовании $\Delta N < 0$ (строки 13-22, 24). Захват воды является весьма слабым для фенантридиновых красителей ЕВ и РI (строки 13, 14), и значительным для остальных лигандов – как интеркаляторов, так и МGB. В единственной известной нам работе [26] для АМД наблюдался не захват, а высвобождение воды $\Delta N = -24$ (строка 23). При этом для этого же антибиотика в работе [22] снова был зафиксирован захват $\Delta N = +32$ (строка 17). Данное расхождение было подвергнуто анализу в [22] с сопутствующей критикой методики, использованной авторами [26] при получении $\Delta N = -24$. Тем не менее окончательного разрешения вопроса знака ΔN в рамках одной и той же экспериментальной методики осмометрии до сих пор произведено не было [10].

В контексте проблемы знака ΔN отметим еще одну важную особенность данных по гидратации комплексов Лиганд-ДНК. В литературе имеет место некоторая «путаница» с определением самой величины ΔN , которая может приводить к принципиальному различию в знаке ΔN . Большинство авторов использует при этом «правильное» соотношение (4), отражающее суммарный эффект изменения гидратации системы лиганд-ДНК в целом. Однако Chalikian (см. табл. 1, строки 6-9) под изменением гидратации подразумевает разность гидратаций комплекса и ДНК в свободном состоянии, т.е. без учета свободного лиганда:

$$\Delta N = N(\text{Комплекс}) - N(\text{ДНК}). \quad (5)$$

Эта разность оказывается положительной, поэтому Chalikian делает ошибочный вывод о том, что волюметрия дает захват воды, что, якобы, согласуется с результатами осмометрии, использующей, однако, формулу (4). Однако корректное волюметрическое значение ΔN , вычисленное по формуле (4), является отрицательным и соответствует высвобождению воды. Интересно, что в аннотации к [26] используется соотношение (4), а в тексте работы – (5).

Как следует из Таблицы 1, экспериментальные методы в большинстве случаев свидетельствуют о том, что комплекс «лиганд-ДНК» гидратирован сильнее, чем свободная ДНК. Однако для некоторых типов лигандов (см., например, строки 1,2,11,12,26) это условие не выполняется, поэтому повышенная гидратированность комплекса не является универсальным свойством ДНК-связывающихся лигандов. Отметим также, что различие в гидратации комплекса и чистой ДНК, вычисленное по

формуле (5), во многих случаях имеет порядок нескольких молекул воды. Такая разница соответствует погрешности методов ММ в определении гидратации; по этой причине анализ гидратации комплекса по отношению к свободной ДНК по данным ММ должен учитывать этот факт.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОБЛЕМНЫХ ПУНКТОВ АНАЛИЗА ГИДРАТАЦИИ КОМПЛЕКСОВ ЛИГАНД-ДНК

Проведенное выше обсуждение литературных данных позволяет выделить следующие проблемные пункты анализа гидратации при комплексообразовании лигандов с ДНК:

1) Имеет место четкое разделение всех методов исследования гидратации на две группы: осмометрия и все остальные. Осмометрия демонстрирует захват дополнительных молекул воды при связывании лигандов с ДНК $\Delta N > 0$, а все другие методы дают, наоборот, высвобождение воды $\Delta N < 0$. Пожалуй, наиболее ярко отличие осмометрии от остальных методов проявляется для НТ, характеризуемого $\Delta N = +60$ в осмометрии и $\Delta N = -55$ – в волюметрии. Известно, что различные методы регистрируют различные типы связанной воды. Так, ММ фиксирует наиболее сильно связанную воду, в то время как волюметрия и осмометрия – слабо связанную [27]. Однако это не объясняет различия в знаке ΔN . Более того, положительное значение ΔN фактически идет вразрез с общепринятой концепцией гидрофобной выгоды связывания лигандов с ДНК [10] и делает существенно неполноценными накопленные в настоящее время знания о структуре и энергетике комплексообразования лигандов с ДНК. И наконец, положительное значение ΔN также подвергает сомнению адекватность в отношении измерения гидратации целой группы методов, таких как СВЧДМ, ММ, волюметрия. Таким образом, проблема знака ΔN является принципиальной и требует разрешения.

2) Достаточно интересным было бы сравнение результатов различных методов по величине измеряемой гидратации. Однако, судя по всему, в настоящее время такое сравнение едва ли возможно по двум причинам. Во-первых, как упоминалось выше, разные методы регистрируют различную по степени связанности воду. Теория каждого метода применительно к гидратации развита недостаточно глубоко, иными словами, в рамках отдельно взятого метода невозможно однозначно указать какую именно воду фиксирует данный метод и, следовательно, выполнить однозначное сравнение результатов разных методов. Во всяком случае ни в одной из известных нам работ такого сравнения произведено не было. Во-вторых, даже в рамках одного метода разброс результатов измерения ΔN по данным разных авторов может достигать больших значений. Например, как упоминалось выше, при исследовании связывания АМД с ДНК методом осмометрии авторы [22] получили значение $\Delta N = +32$ (строка 17), а в [26] установлено $\Delta N = -24$ (строка 23). Кроме этого, хорошо известна зависимость результатов применения осмометрии от типа используемого осмолита. Так, например, при комплексообразовании АМД с ДНК ΔN оказалось равным 6.0 ± 0.4 для этиленгликоля, 11.2 ± 0.7 для глицерола, 21.0 ± 3.0 для бетаина и 56.4 ± 4.7 для сахарозы [26]. При связывании НТ с ДНК ΔN составило 78 ± 11 для триэтиленгликоля, 51 ± 6 для ацетамида, 51 ± 3 для бетаина и 67 ± 8 для тетраэтиленгликоля [27].

Выделенные выше проблемные пункты в современных данных по гидратации необходимы для правильной интерпретации и анализа имеющейся в литературе информации по гидратации в системах Лиганд-ДНК.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПРОБЛЕМЫ РАСХОЖДЕНИЯ ЗНАКА ΔN

Наиболее существенной из рассмотренных выше проблемных пунктов анализа гидратации является проблема разного знака ΔN по данным осмометрии и всех остальных методов. Рассмотрим предложенные в литературе варианты интерпретации этого расхождения.

Положительное осмометрическое значение $\Delta N > 0$ авторы [27] объясняют конформационными изменениями ДНК и лиганда при связывании, что влияет на структуру дальней гидратной оболочки, а также образованием водных мостиков. Однако такая интерпретация носит декларативный характер и не получила пока экспериментальной верификации. Попытка косвенной интерпретации была дана в работе [24], в которой авторы предположили, что методы осмометрии и волюметрии измеряют разную по качеству связанную воду. Считается также, что осмометрия недооценивает вклад сильно-связанной воды и переоценивает вклад слабо-связанной воды, что может быть, в принципе, методически скорректировано [29]. Согласно гипотезе, выдвинутой авторами [14] для объяснения характера изменения гидратного слоя ДНК при связывании с НТ, изменение гидратации при комплексообразовании лигандов носит кооперативный характер. Однако данное предположение до сих пор не получило экспериментального подтверждения.

В работах [10,16] было высказано мнение, что применение метода осмометрии к ДНК-связывающимся лигандам может быть некорректным по трем основным причинам. Во-первых, присутствие осмолита в растворе может существенно влиять на характер связывания лиганда с ДНК. Во-вторых, осмолиты относятся к классу соединений, разрушающих структуру воды [30]. Это означает, что процесс высвобождения, либо связывания воды при комплексообразовании лиганд-ДНК, также будет зависеть от концентрации самого осмолита и степени упорядоченности воды в его окрестности. В-третьих, одним из допущений метода осмометрии является отсутствие взаимодействия осмолита как с ДНК, так и с лигандом, причем прямых экспериментальных подтверждений этому не существует, за исключением выводов об отсутствии взаимодействия ДНК-осмолит, основанных на косвенном сравнительном анализе [21-24]. В частности, молекулы осмолитов должны быть электронейтральными для исключения электростатических взаимодействий с ДНК и лигандом. Если учесть, что в структуру типичного осмолита входят группы, способные к водородному связыванию, то как минимум взаимодействие лиганд-осмолит оказывается вполне возможным. В качестве осмолитов используются бетаин (триметилглицин), ацетамид, и различные гликоли (триэтилен- и тетраэтилен-). Однако все молекулы осмолитов содержат донорно-акцепторные группы Н-связей, обеспечивающие эффективное связывание с ними молекул воды (рис. 1).

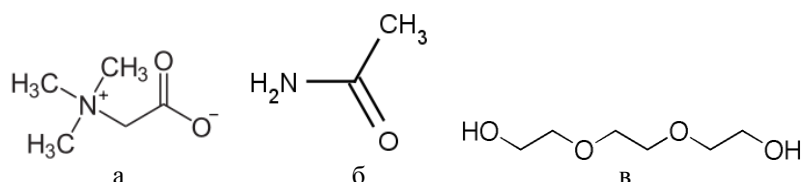


Рис. 1. Структурные формулы осмолитов: бетаин (а), ацетамид (б), триэтиленгликоль (в)

Поэтому молекулы осмолитов с помощью данных групп могут, в принципе, также связываться с молекулами ДНК и лиганда. Кроме того, концентрация осмолита в смешанном растворе «вода-соль-осмолит-ДНК-лиганд» настолько велика (~0.5 кг/кг буфера [27]), что свойства раствора весьма отличаются от обычного для ДНК (близкого

к физиологическим условиям) водно-солевого, что существенно влияет на параметры ДНК и раствора в целом. Так, в работе [27] при данной концентрации наблюдается снижение температуры плавления на $\Delta T_m \approx 10$ °C при $T_m = 55$ °C без осмолита.

В целом необходимо отметить, что общепризнанной интерпретации проблемы отличия знака изменения гидратации по методу осмометрии и остальных методов в настоящее время не существует. Вместе с тем новые результаты по методу СВЧДМ усиливают представление о том, что все же имеет место именно вытеснение молекул воды при связывании лигандов с ДНК и метод осмометрии, возможно, не является вполне корректным применительно к системам Лиганд-ДНК, на что ранее указывалось в работах [10,16,30-33]. Отметим также зависимость результатов метода осмометрии от используемой методики анализа изотерм связывания (см. выше обсуждение разного знака ΔN по отношению к антибиотику AMD в рамках метода осмометрии), а также зависимость изменения гидратации ΔN при комплексообразовании лигандов с ДНК от типа осмолита [26,27].

Таким образом, проведенный в настоящей работе анализ литературных данных с учетом новых данных СВЧДМ, фактически подтверждает высказываемое различными авторами ранее мнение о некорректности метода осмометрии по отношению к измерению изменения гидратации при комплексообразовании лигандов с ДНК. На наш взгляд, имеет место вытеснение воды при связывании, о чем свидетельствует подавляющее большинство экспериментальных и теоретических методов.

ВЫВОДЫ

Проведенный анализ литературных данных с учетом новых результатов СВЧДМ позволил выделить основные проблемные пункты в оценке изменения гидратации при комплексообразовании лигандов с ДНК. Из них наиболее важным и принципиальным является вопрос о том, высвобождается (данные метода осмометрии) или захватывается (данные остальных методов) при этом вода. Общепризнанной интерпретации данного противоречия на сегодняшний день не существует. Однако, учитывая, что результаты осмометрии выпадают из ряда данных всех остальных методов, по-видимому, необходим ре-анализ методики, положенной в основу этого метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jayaram B. The role of water in protein-DNA recognition / B. Jayaram, T. Jain // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. – V.33. – P. 343-361.
2. Schwabe J.W. The role of water in protein-DNA interactions / J.W. Schwabe // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1997. – V.7. – P. 126-134.
3. Sequence-specific minor groove binding by bis-benzimidazoles: water molecules in ligand recognition / C. Bailly, G. Chessari, C. Carrasco, [et al.] // *Nucleic Acids Res.* - 2003. – V.31. – P. 1514-1524.
4. Pal S.K. Water at DNA surfaces: Ultrafast dynamics in minor groove recognition / S.K. Pal, L. Zhao, A.H. Zewail // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – V.100. – P. 8113-8118.
5. Nguyen B. A Role for Water Molecules in DNA-Ligand Minor Groove Recognition / B. Nguyen, S. Neidle, W.D. Wilson // *Acc. Chem. Res.* – 2009. – V.42. - P. 11-21.
6. Spectroscopic and calorimetric study of DNA interaction with a new series of actinocin derivatives / V. Maleev, M. Semenov, E. Kruglova, [et al.] // *J. Mol. Struct.* – 2003. – V.645. – P. 145-158.
7. Williams H.E.L. Structure, dynamics and hydration of the nogalamycin-d(ATGCAT)₂ complex determined by NMR and molecular dynamics simulations in solution / H.E.L. Williams, M.S. Searle // *J. Mol. Biol.* - 1999. – V.290. – P. 699-716.
8. Liepinsh E. NMR observation of individual molecules of hydration water bound to DNA duplexes: direct evidence for a spine of hydration water present in aqueous solution / E. Liepinsh, G. Otting, K. Wüthrich // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V.20. – P. 6549-6553.
9. Subramanian P.S. Theoretical considerations on the "spine of hydration" in the minor groove of d(CGCGAATTCGCG).d(GCGCTTAAGCGC): Monte Carlo computer simulation / P.S. Subramanian, G. Ravishanker, D.L. Beveridge // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1988. – V.85. – P. 1836-1840.

10. Kostjukov V.V. Изменение гидратации при комплексообразовании ароматических лигандов с ДНК: моделирование методом молекулярной динамики / V.V. Kostjukov, N.M. Homutova, M.P. Evstigneev // *Биополимеры и клетка*. – 2010. – Т. 26. – С. 1–9.
11. Kashpur V.A. Изменения гидратации при образовании комплексов ДНК-лиганд по данным диэлектromетрии / V.A. Kashpur, O.V. Horunzhaja, V.Ja. Maleev // *Dokl. NANU*. – 2010. - №7. – С. 170 – 175.
12. Изменения гидратации при образовании комплексов ДНК с некоторыми интеркаляторами / O.V. Horunzhaja, V.A. Kashpur, D.A. Pesina, V.Ja. Maleev // *Бифиз. вистник*. – 2010. - Vip. 24 (1). – С. 5 – 13.
13. Maleev V.Ya. A spectroscopic and calorimetric study of dna complexation with a new series of actinocin derivatives (ActII-ActV) / V.Ya. Maleev, M.A. Semenov, E.B. Kruglova // in “Anti-Cancer Drug Design: Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazone Derivatives”, Ed. by A.N. Veselkov and D.B. Davies, SevNTU press, 2002, P. 47-126.
14. Han F. Association of the minor groove binding drug Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)₂: volumetric, calorimetric, and spectroscopic characterizations / F. Han, N. Taulier, T.V. Chalikian // *Biochemistry*. – 2005. – V.44. – P. 9785-9794.
15. Parsegian V.A. Macromolecules and water: probing with osmotic stress / V.A. Parsegian, R.P. Rand, D.C. Rau // *Methods Enzymol.* – 1995. - V.259. – P. 43-94.
16. Kostjukov V.V. Изменение гидратации при связывании лигандов с малым желобком ДНК / V.V. Kostjukov, M.P. Evstigneev // *Физика живого*. - 2010. - Т. 18. - С. 34-40.
17. Molecular dynamics simulations and free energy calculations of netropsin and distamycin binding to an AAAAA DNA binding site / J. Dolenc, C. Oostenbrink, J. Koller, W.F. van Gunsteren // *Nucleic Acids Res.* – 2005. - V.33. – P. 725–733.
18. On the Molecular Mechanism of Drug Intercalation into DNA: A Simulation Study of the Intercalation Pathway, Free Energy, and DNA Structural Changes / A. Mukherjee, R. Lavery, B. Bagchi, J.T. Hynes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V.130. – P. 9747–9755
19. Influence of Drug Binding on DNA Hydration: Acoustic and Densimetric Characterizations of Netropsin Binding to the Poly(dAdT)·Poly(dAdT) and Poly(dA)·Poly(dT) Duplexes and the Poly(dT)·Poly(dA)·Poly(dT) Triplex at 25 °C / T.V. Chalikian, G.E. Plum, A.P. Sarvazyan, K.J. Breslauer // *Biochemistry*. – 1994. – V.33. – P. 8629-8640.
20. Han F. Hydration Changes Accompanying Nucleic Acid Intercalation Reactions: Volumetric Characterizations / F. Han, T.V. Chalikian // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V.125. – P. 7219-7229.
21. Qu X. Contrasting Hydration Changes for Ethidium and Daunomycin Binding to DNA / X. Qu, J.B. Chaires // *J. Am. Chem. Soc.* - 1999. - Vol.121. – P. 2649 – 2650.
22. Qu X. Hydration Changes for DNA Intercalation Reactions / X. Qu, J.B. Chaires // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V.123. – P. 1–3.
23. Hydration of Drug–DNA Complexes: Greater Water Uptake for Adriamycin Compared to Daunomycin / H. Yu, J. Ren, J.B. Chaires, X. Qu // *J. Med. Chem.* – 2008. – V.51. – P. 5909–5911.
24. Hydration Changes Accompanying the Binding of Minor Groove Ligands with DNA / N.N. Degtyareva, B.D. Wallace, A.R. Bryant, [et al.] // *Biophys. J.* – 2007. – V.92. – P. 959–965.
25. Sidorova N.Y. The osmotic sensitivity of netropsin analog binding to DNA / N.Y. Sidorova, D.C. Rau // *Biopolymers*. – 1995. – V.35. – P. 377–384.
26. Neto J.R. Water Regulation of Actinomycin-D Binding to DNA: The Interplay Among Drug Affinity, DNA Long-Range Conformation, and Hydration / J.R. Neto, M.F. Colombo // *Biopolymers*. – 2000. – V.53. – P. 46–59.
27. Hydration Changes in the Association of Hoechst 33258 with DNA / J.R. Kiser, R.W. Monk, R.L. Smalls, J.T. Petty // *Biochemistry*. – 2005. – V.44. – P. 16988-16997
28. Kostjukov V.V. Jenerģija interkaljacji ароматических гетероциклических лигандов в ДНК и ее разделение на аддитивные составляющие / V.V. Kostjukov // *Биополимеры и клетка*. - 2011. - Т. 27. - С. 258–267.
29. Shimizu S. Estimating hydration changes upon biomolecular reactions from osmotic stress, high pressure, and preferential hydration experiments / S. Shimizu // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. - V.101. – P. 1195–1199.
30. Parsegian V.A. Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives / V.A. Parsegian, R.P. Rand, D.C. Rau // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. - V.97. – P. 3987-3992.
31. Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments in vitro / E.S. Courtenay, M.W. Capp, C.F. Anderson, M.T. Record // *Biochemistry*. 2000. – V.39. – P. 4455-71.
32. Timasheff S.N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components / S.N. Timasheff // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. - V.99. – P. 9721-9726.
33. Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria / P.R. Davis-Searles, A.J. Saunders, D.A. Erie, [et al.] // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* - 2001. – V.30. – P. 271-306.