

УДК 577.3

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОФЕИНА И ПРОИЗВОДНЫХ АКТИНОЦИНА С ДНК МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ II. РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ КОМПЛЕКСА ДНК- ЛИГАНД

Д.Б. Анищенко, А.В. Шестопалова, Е.Г. Березняк, В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники им. А.Я.Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085

e-mail: anyden@ire.kharkov.ua, shestop@ire.kharkov.ua

Поступила в редакцию 24 июня 2003 г.

Методом молекулярной динамики изучены два типа комплексов между фрагментами ДНК и лигандами - кофеином и производным актиноцина. Получены молекулярные модели интеркаляции кофеина и производного актиноцина в GC-сайт дуплекса $d(AGCT)_2$ и их внешнего связывания в малом желобке дуплекса $d(GATAC)_2$. Проанализированы энергетические характеристики изученных систем и изменения первичных гидратных оболочек взаимодействующих компонентов при их комплексообразовании. Показано, что образование комплексов производного актиноцина с ДНК является энергетически и структурно более выгодным, чем комплексов кофеина с ДНК. Установлено, что степень разрушения моногидратного слоя двойной спирали при образовании комплекса ДНК-лиганд определяется способом связывания лиганда, его возможностью образовывать водородные связи с молекулами воды и мало зависит от линейных размеров лиганда.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, производное актиноцина, кофеин, комплексообразование, молекулярная динамика, гидратация.

Направленный синтез новых лигандов, способных связываться с определенной последовательностью нуклеиновых оснований ДНК, представляет большой интерес. Небольшие синтетические молекулы, взаимодействующие с определенным сайтом в последовательности ДНК, используются для селективного ингибирования экспрессии генов и применяются в химиотерапии. В последние два десятилетия разработка таких лигандов ведется на основе принципов структурной комплементарности взаимодействующих соединений. При этом структурное соответствие является лишь отправной точкой для поиска, и включение в конструирование новых веществ энергетических факторов предоставляет более широкие возможности для отбора препаратов с направленным действием. Энергетические характеристики определяются межмолекулярными силами, которые управляют определенной реакцией связывания, и, что особенно важно, дают детальное количественное представление об особенностях строения лиганда, отвечающих за специфическое связывание. В то же время, экспериментальные значения энергии связывания включают в себя всю совокупность взаимодействий в системе, и оценка вкладов отдельных сил без привлечения молекулярного моделирования затруднена [1].

В настоящей работе мы рассматриваем различные вклады в энергию взаимодействия двух лигандов, кофеина (Cf) и производного актиноцина (ActII⁺), при их связывании с фрагментами ДНК, а также изменения в первой гидратной оболочке этих соединений при образовании комплекса ДНК-лиганд. Роль ион-гидратного окружения в поддержании трехмерной структуры и функционировании ДНК неоспорима [2-4], поэтому при моделировании комплексообразования лиганда с ДНК необходимо учитывать перестройку их гидратных оболочек и участие молекул воды в стабилизации комплекса.

Интерес к кофеину, несмотря на многолетние исследования, не ослабевает. Помимо широко известного действия на уровне центральной нервной системы, кофеин обладает биологической активностью и на клеточном уровне [5-7]. В частности, он способен изменять фармакологическую активность препаратов, взаимодействующих с ДНК [8-10], возможно из-за взаимной конкуренции между Cf и присутствующим в растворе препаратом за места посадки на двойной спирали.

ActII⁺ – новосинтезированное соединение [11,12], аналог противоопухолевого препарата актиномина D, отличающийся от него структурой боковых цепей. Биологическая активность актиномина D на молекулярном уровне обусловлена его интеркаляционным взаимодействием с ДНК. Роль боковых цепей до сих пор неизвестна. Возможно, они располагаются в минорном желобке ДНК и неспецифически взаимодействуют с группами сахарофосфатного остова.

Целью нашего исследования было выяснение молекулярных механизмов конкуренции Cf и ActII⁺ при связывании с ДНК, а также определение связи между структурой этих лигандов и вкладами различных сил в стабилизацию комплекса ДНК-лиганд.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование комплексов «фрагмент ДНК – лиганд» (Cf или ActIIГ) было выполнено методом молекулярной динамики с использованием силового поля AMBER 96 [13] в NVT ансамбле с временным шагом $1 \cdot 10^{-15}$ с. Нами были рассмотрены два типа комплексов: интеркаляция лигандов в GC-сайт дуплекса $d(AGCT)_2$, и встраивание лигандов в малый желобок дуплекса $d(GATAC)_2$. Стартовая структура GC-сайта построена на основе рентгеноструктурных данных (PDB ID: 1dsd из базы данных [14]). На первом этапе моделирования комплексы были оптимизированы в вакуумном приближении. После процедуры оптимизации комплексы ДНК-лиганд были размещены в ячейках, которые содержали от 1000 до 1250 молекул воды, в зависимости от размера моделируемой системы (модель молекулы воды TIP3P [15]). Расчеты выполнялись в периодических граничных условиях. Общее время моделирования составляло $320 \cdot 10^{-12}$ с. Поскольку водородная связь (ВС) не может быть строго определена у мгновенных структур (I-структур) [16], на протяжении последних $10 \cdot 10^{-12}$ с систему охлаждали до 10К для получения «замороженных» F-структур. Такие структуры представляют собой конфигурации, которые соответствуют ближайшему к данной мгновенной I-структуре локальному минимуму потенциальной энергии для каждой изученной системы. В F-структурах обнаруживаются основные черты строения систем, а ВС определяются практически однозначно. ВС определяли по геометрическому критерию: расстояние между атомами донора и акцептора ВС не превышало 3.2 Å, расстояние между атомом водорода и акцептором ВС – не более 2.6 Å [17].

В сухом состоянии лиганд ActII находится в виде соли ActII(Cl)₂. При растворении происходит двухступенчатая диссоциация с поэтапным отделением ионов Cl⁻. Нами рассмотрен катион ActII с общим зарядом +1 (лиганд ActII сохраняет один из ионов Cl⁻).

Координаты и заряды на атомах молекулы Cf (рис. 1а) и ActIIГ [18] были получены с помощью *ab initio* расчетов с базисным набором 3-21G* на основании PC версии программы GAMESS PC [19] из программного пакета GAMESS (US) QC [20].

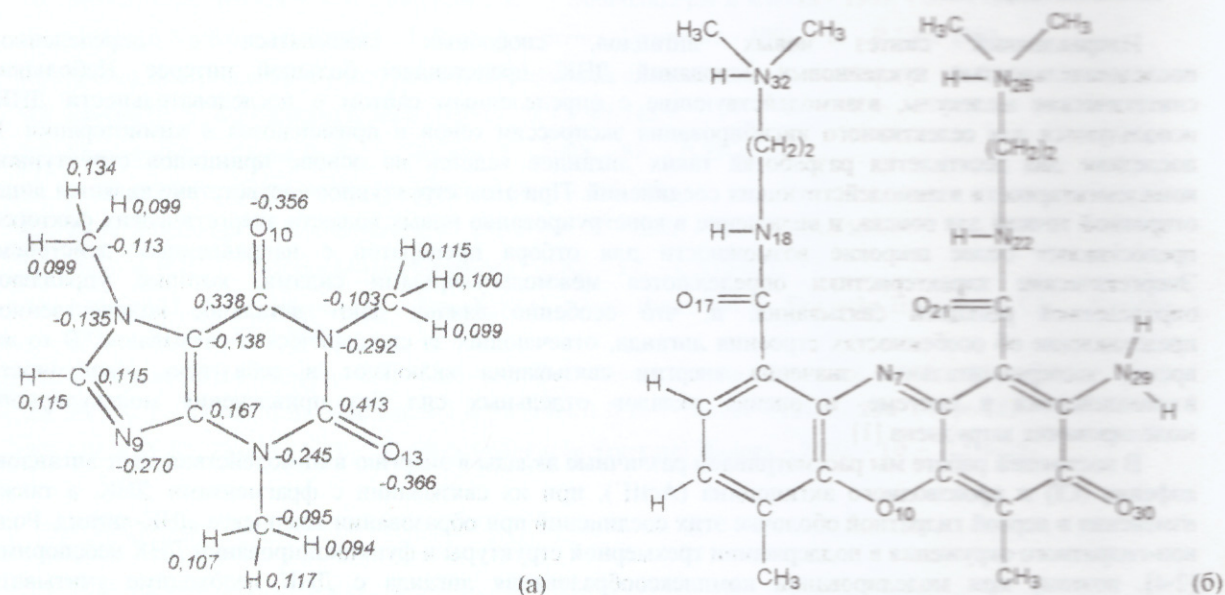


Рис. 1. Структура молекулы Cf (заряды в а.е.) (а) и ActIIГ (б).

Молекулярное узнавание и последующее связывание лиганда с мишенью зависит от нескольких факторов, как энтальпийной, так и энтропийной природы, определяющих энергетическую выгодность образования комплекса. К таким факторам относятся: структурная и энергетическая комплементарность лиганда и мишени; их конформационные изменения при образовании комплекса, а также возникающее при этом уменьшение числа степеней свободы; выгодность частичной или полной дегидратации взаимодействующих участков и другие вклады [1].

В нашем исследовании энергию взаимодействия лиганда (ΔG) с фрагментом ДНК мы рассчитывали по формуле:

$$\Delta G = \Delta E + \Delta G_s + \Delta G_e \quad (1)$$

где ΔE – молекулярно-механическая энергия взаимодействия (в приближении силового поля AMBER 96), которая состоит из ван-дер-ваальсовых (*vdw*) и электростатических (*elst*) взаимодействий;

ΔG_s – изменение энергии гидратации при образовании комплекса, которое представляет собой сумму изменения энергии гидратации лиганда (*lig*) и двойной спирали (*hel*);

ΔG_c – энергетический вклад, который определяется конформационной перестройкой двойной спирали при связывании лиганда и равен разности между значением энергии невозмущенной спирали и деформированной спирали. Этот вклад состоит из изменения молекулярно-механической энергии (*mm*) и энергии гидратации (*solv*).

Энергия гидратации рассчитывалась по формуле [14]:

$$G_s = \sum(w_i \times S_i) \quad (2)$$

где S_i – площадь поверхности i -го атома, w_i – весовой коэффициент. При вычислении площади поверхности молекулы лиганда, доступной растворителю, был использован метод Bodor et al. [22].

Рассчитанное таким образом значение ΔG является относительным и не может непосредственно сравниваться с экспериментальными значениями, поскольку не учитывает изменений энтропии, которые вызваны уменьшением степеней свободы лигандов и ДНК при образовании комплексов, а также изменением структуры растворителя. Только в последнее время предпринимается ряд попыток вычислить абсолютные, соотносимые с экспериментом, энергии взаимодействия [23,24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов молекулярно-динамического моделирования позволяет оценить энергетическую выгодность комплексообразования ДНК-лиганд (кофеин или ActII⁺) по двум типам связывания и вклад разных составляющих полной энергии межмолекулярного взаимодействия в стабильность таких комплексов.

Таблица 1. Полная энергия взаимодействия ΔG и ее составляющие (в kcal/mol) для комплексов ДНК-лиганд по типу интеркаляции (*) и по типу внешнего связывания в малом желобке (**).

SYSTEM	ΔG	ΔE	<i>vdw</i>	<i>elst</i>	ΔG_s	<i>hel</i>	<i>lig</i>	ΔG_m	<i>solv</i>	<i>mm</i>
d(AGCT) ₂ +ActII ⁺ (*)	-23.95	-86.93	-55.59	-31.34	20.35	9.73	10.62	42.63	8.30	34.33
d(AGCT) ₂ +CF (*)	-5.14	-36.24	-35.91	-0.33	13.12	3.44	9.68	17.98	-7.76	25.74
d(GATAC) ₂ +ActII ⁺ (**)	-72.77	-78.25	-33.23	-45.02	10.97	7.02	3.95	-5.49	-6.14	0.65
d(GATAC) ₂ +CF (**)	-12.80	-29.08	-21.43	-7.64	10.48	1.36	9.12	5.80	2.19	3.61

В таблице 1 и на рис. 2 представлены полная энергия взаимодействия ΔG и ее составляющие (формула (1)) для интеркаляционных комплексов ActII⁺ и Cf с фрагментом ДНК (дуплекс d(AGCT)₂).

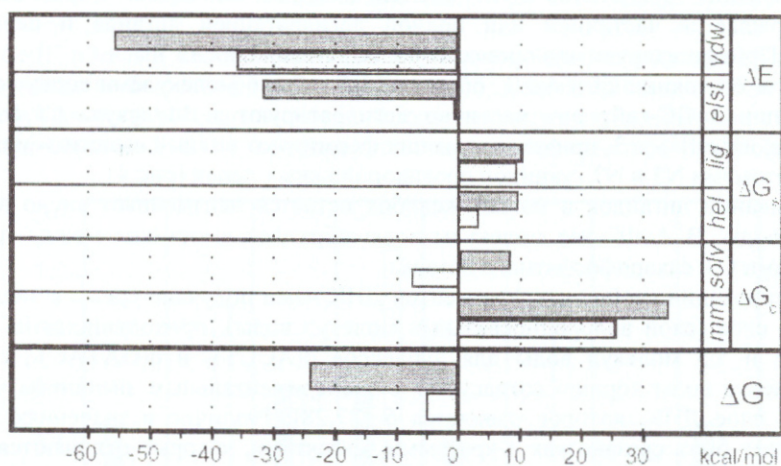


Рис. 2. Энергии взаимодействия Cf () и ActII⁺ (■) с фрагментом d(AGCT)₂ для интеркаляционного комплекса.

Анализ приведенных величин указывает на энергетическую выгодность комплексов тетрауклеотида с обоими лигандами, образуемых по типу интеркаляции. Прежде всего, эта выгодность обуславливается вкладами молекулярно-механической составляющей (ΔE), в частности, ее ван-дер-ваальсовыми компонентами для обоих лигандов и электростатической – для ActII⁺, который имеет общий положительный заряд. Положительные вклады конформационной составляющей ΔG_c в общее значение ΔG – полной энергии взаимодействия в комплексе – объясняются существенными энергетическими затратами, которые

необходимы для создания интеркаляционного сайта (раскручивание двойной спирали, растяжение ее вдоль оси, смещение пар оснований), и хорошо согласуются со значениями, рассчитанными в работах [23,24].

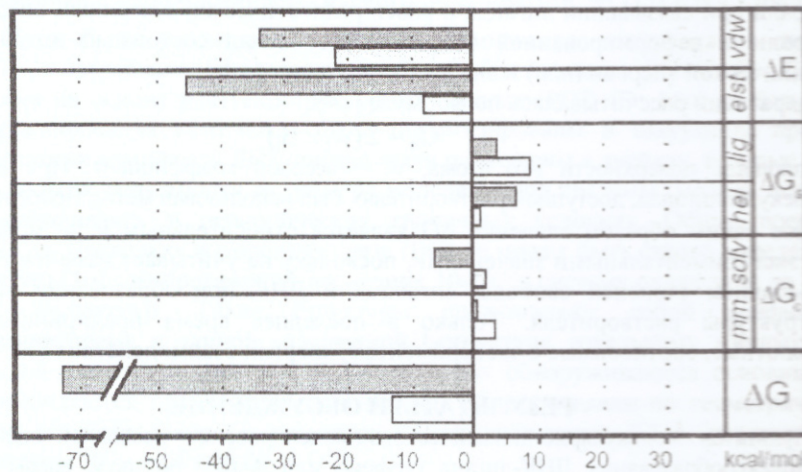


Рис. 3. Энергии взаимодействия Cf () и ActII⁺ (■) при их встраивании в малый желобок фрагмента d(GATAC)₂.

На рис. 3 и в таблице 1 представлены энергетические характеристики взаимодействия ActII⁺ и Cf с ДНК при их встраивании в малый желобок. Как видно из этих данных, комплекс d(GATAC)₂-ActII⁺ более стабилен. Наблюдаемая стабильность определяется отрицательными значениями ΔE и ΔG_e. То есть встраивание ActII⁺ в малый желобок стабилизирует двойную спираль, в отличие от случая интеркаляции лигандов между парами оснований. Дестабилизирующий вклад вносит изменение энергии гидратации комплекса ДНК-лиганд.

Необходимо отметить, что полученные значения ΔG превышают экспериментальные, что связано с отсутствием энтропийных составляющих в формуле (1). Однако соотношение значений ΔG для двух разных типов комплексов «фрагменты ДНК – ActII⁺» хорошо согласуются со значениями энтальпий связывания, полученными на основе спектрофотометрических исследований [25]. Таким образом, величину ΔG можно рассматривать как адекватную оценку различных типов взаимодействий ДНК-лиганд.

Не менее интересными являются результаты анализа изменения гидратного окружения в процессе комплексообразования фрагментов ДНК и исследованных лигандов. Образование комплекса ДНК-лиганд сопровождается частичной или полной дегидратацией лиганда и перестройкой гидратных оболочек ДНК. Проанализируем эти процессы более детально.

В свободном состоянии Cf и ActII⁺ образуют ВС с 2 и 6 молекулами воды, соответственно [18,26]. При интеркаляции в GC-сайт они частично дегидратируются. Молекула Cf сохраняет ВС с одной молекулой воды, а ActII⁺ - с 3, причем две из них формируют водный «мостик» между группами HN32 и O17 лиганда и атомами N3 и N2 гуанинов противоположных цепей (рис.4).

При встраивании лигандов в малый желобок остается неизменным число водородносвязанных с ними молекул воды. В ActII⁺ две молекулы воды образуют «мостики» между группами HN29 и O17 лиганда и атомами O3' сахарофосфатного остова.

При моделировании свободных фрагментов ДНК нами получено среднее число молекул воды (n) в моногидратном слое (слой водородносвязанных молекул воды), приходящихся на пару оснований. Оно составляет 5.75 и 5.5 молекул воды для дуплексов d(AGCT)₂ и d(GATAC)₂, соответственно. Такое количество молекул воды хорошо согласуется с экспериментальным значением числа молекул воды в моногидратном слое ДНК, которое равняется 6 [27,28]. Различие в значениях n для рассмотренных фрагментов может быть связано как с краевыми эффектами, которые отличаются для спиралей разной длины, так и с разным содержанием AT/GC пар в них [29].

Изменения в моногидратном слое фрагмента ДНК при образовании комплексов представлены на рис. 5, где Δn – разность между значениями n для комплекса и свободного фрагмента ДНК.

Интеркаляция ActII⁺ и Cf вызывает одинаковое уменьшение числа молекул воды, которые образуют ВС со спиралью. Отличия обнаруживаются, во-первых, в разной степени гидратации оснований и сахарофосфатного остова. ActII⁺ больше влияет на гидратацию остова, так как имеет расположенные в малом желобке боковые аминокислотные цепочки. Кофеин, в свою очередь, в большей степени уменьшает гидратацию оснований.

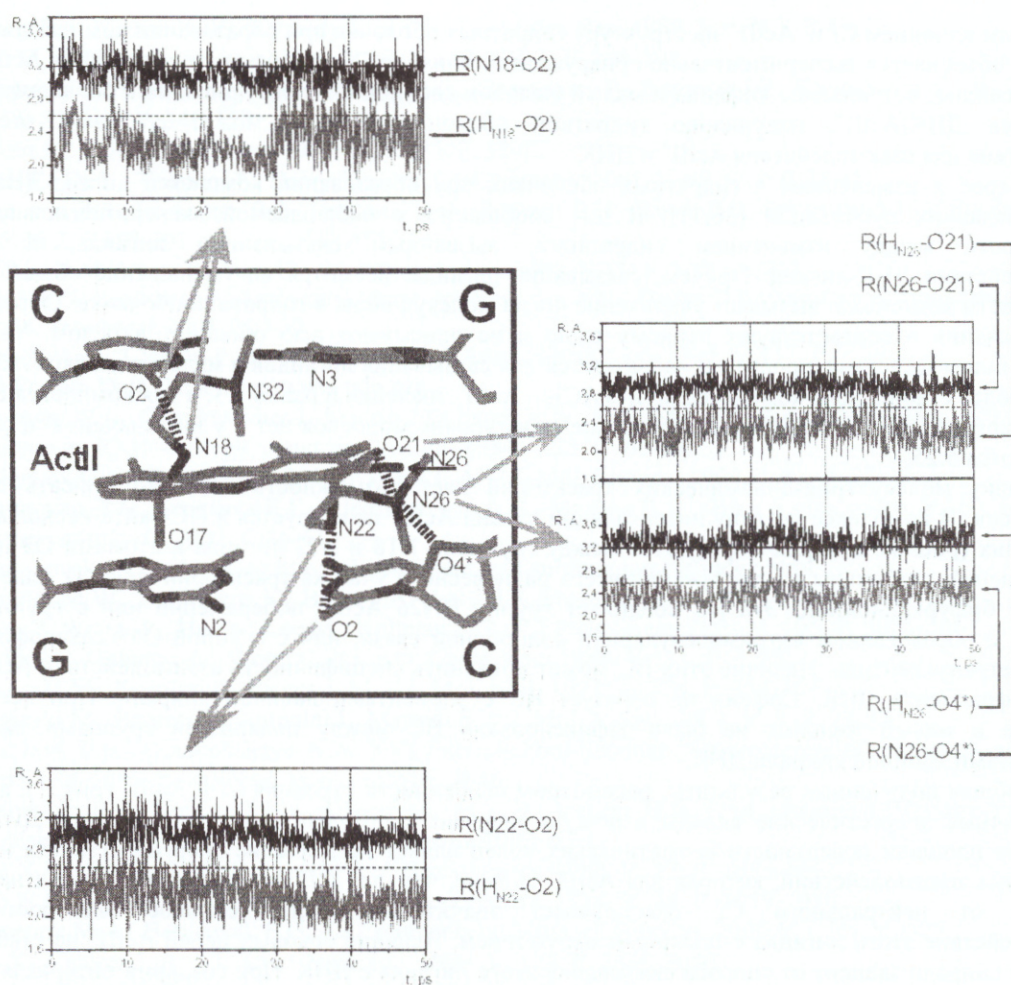


Рис. 4. Структура и динамика водородных связей при интеркаляции ActII⁺ в GC-сайт (атомы водорода и молекулы воды не показаны).

Встраивание ActII⁺ в малый желобок приводит к меньшему изменению гидратации d(GATAC)₂, чем встраивание Cf, несмотря на большие размеры ActII⁺ (рис. 5). Характер изменений, которые возникают в гидратации сахарофосфатного остова и оснований, отличается от случая интеркаляции: ActII⁺ больше влияет на гидратацию оснований, а Cf – на гидратацию сахарофосфатного остова. Возможно, именно

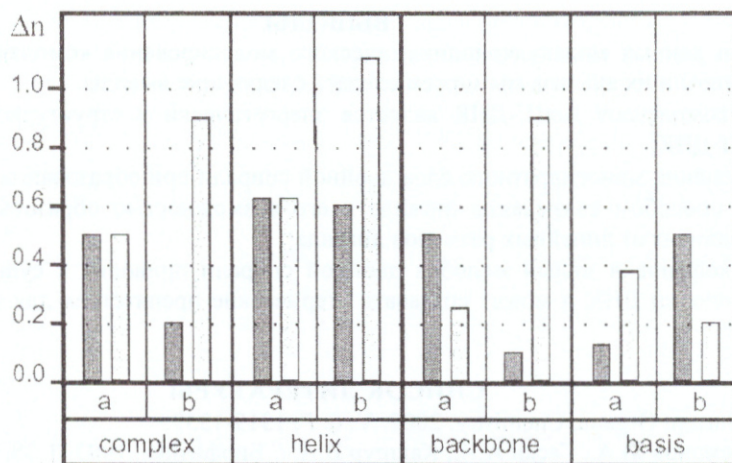


Рис. 5. Изменение среднего числа молекул воды в моногидратном слое, приходящихся на пару оснований (Δn) для интеркаляции (a) и при связывании в малом желобке (b) молекулы Cf (□) и ActII⁺ (■).

различным влиянием Cf и ActII⁺ на структуру гидратных оболочек при образовании комплексов в малом желобке объясняется экспериментально обнаруженное влияние Cf на константы связывания ActII⁺ с ДНК [25]. Очевидно, встраивание кофеина в малый желобок двойной спирали приводит к большему, чем для комплекса ДНК-ActII⁺, нарушению гидратной оболочки ДНК и может создавать стерические препятствия для взаимодействия ActII⁺ и ДНК.

Интерес к изменениям в гидратных оболочках при образовании комплексов лиганд-ДНК вызван рядом недавних публикаций [30,31]. В них сообщается о наблюдаемой экспериментально прямой зависимости между изменением гидратации, вызванным связыванием лиганда, и энергией взаимодействия ДНК-лиганд. Причем, связывание лиганда, несмотря на уменьшение общей площади поверхности комплекса, вызывает увеличение числа молекул воды в гидратной оболочке. Определенные нами значения n соответствуют первому слою и не описывают всю оболочку в целом. Увеличение энергии взаимодействия с ростом n наблюдается для связывания лигандов в малом желобке (табл. 1, рис. 5): для более стабильного комплекса d(GATAC)₂ – ActII⁺ значение n равно 5.3, а для комплекса с Cf – 4.6. При интеркаляции Cf и ActII⁺ такой зависимости на уровне монослоя нет – у них значения n совпадают и равняются 5.25.

Анализ молекулярно-динамических траекторий дает возможность детально описать структуру комплексов. В комплексе по типу интеркаляции лиганд ActII⁺ фиксируется в GC-сайте несколькими ВС. Две из них (рис. 4), которые образуются между группами N18 и N22 лиганда и атомами O2 цитозинов разных цепей, стабильны на протяжении всего равновесного участка траектории (рис. 4). Еще одна ВС является бифуркационной. Эта ВС соединяет группу HN26 ActII⁺ попеременно или с группой CO21 лиганда, с образованием внутримолекулярной водородной связи, или с группой O4* сахарофосфатного остова тетрануклеотида. Наличие этих ВС может объяснить специфичность взаимодействия ActII⁺ с GC-сайтом фрагмента ДНК. Кофеин не образует ВС с элементами двойной спирали. При встраивании лигандов в малый желобок не было зафиксировано ВС между полярными группами лигандов и фрагментами двойной спирали ДНК.

Обобщая полученные результаты, рассмотрим особенности строения Cf и ActII⁺ (рис. 1), влияющие на различные энергетические вклады в общую энергию взаимодействия для комплекса ДНК-лиганд. Величина площади поверхности ароматических колец влияет на значение энергии стэкинга и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которая для ActII⁺ больше, чем для Cf. Положительный заряд на ActII⁺, в отличие от нейтрального Cf, обеспечивает значительно более сильное электростатическое взаимодействие этого лиганда с полярным окружением. Влияние боковых цепей ActII⁺ на стабильность двойной спирали зависит от способа связывания этого лиганда с ДНК. При создании интеркаляционного сайта для ActII⁺ требуется большая, по сравнению с Cf, перестройка двойной спирали, и, как следствие, большие затраты энергии. При встраивании в малый желобок заряженные хвосты ActII⁺ могут «стягивать» противолежащие цепочки, уменьшая отталкивание между фосфатами, и, таким образом, стабилизируют двойную спираль. Различия в структуре лигандов отражены и в особенностях их гидратации. При этом определяющие факторы – это количество, доступность и взаимная ориентация полярных групп. Необходимо отметить, что приведенные данные позволяют наметить пути направленного изменения химического строения рассмотренных веществ с целью модификации их биологической активности.

ВЫВОДЫ

На основании данных молекулярно-динамического моделирования комплексов фрагментов ДНК с ActII и кофеином и их анализа мы можем сделать следующие выводы:

- образование комплексов ActII⁺-ДНК является энергетически и структурно более выгодным, чем комплексов Cf-ДНК;
- степень разрушения моногидратного слоя двойной спирали при образовании комплекса ДНК-лиганд определяется способом связывания лиганда и его возможностью образовывать ВС с молекулами воды и мало зависит от линейных размеров лиганда;
- встраивание кофеина в малый желобок двойной спирали приводит к существенному нарушению гидратной оболочки ДНК и может создавать стерические препятствия для взаимодействия ActII⁺ и ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lazaridis T. // Current Organic Chemistry. 2002. V. 6. P. 1319-1332.
2. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // Биофизика. 1993. Т.38, № 5. С.768-790.
3. Woda J., Schneider B., Patel K., Mistry K., Berman H.M. // Biophys.J. 1998. V.75. N 5. P.2170-2177. 98.
4. Auffinger P., Westhof E. // in: Water management in the design and distribution of quality foods. Editors: Ross Y.H., Leslie R.B., Lillford P.J. Technomic Publishing Co Inc. Basel. 1999. P. 165-198.

5. Warters R.L., Lyons B.W., Kennedy K., Li T.M. // *Mutat. Res.* 1989. V.6. N 1. P.43-55.
6. Jafari M, Rabbani A. // *Toxicology.* 2000. V.149. N 2-3. P. 101-108.
7. Deplanque G., Vincent F., Mah-Becherel M.C., Cazenave J.P., Bergerat J.P., Klein-Soyer C., Br J. // *Cancer.* 2000. V.83. N 3. P. 346-353.
8. Stockert J.C. // *Acta Histochem.* 1989. V.87. N 1. P. 33-42.
9. Bedher E., Du L., Traganos F., Darzynkiewicz Z. // *Cytometry.* 2001. V. 43. N 1. P. 38-45.
10. Веселков Д.А., Кодинцев В.В., Пахомов В.И., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Биофизика.* 2000. Т.45. № 2. С.193-201
11. Wadkins R.M., Vladu B., Tung Ch.-Sh. // *Biochemistry.* 1998. V.37. P. 11915-11923.
12. Glibin E.N. Synthesis of phenoxazone drugs. in: Veselkov A.N., Davies D.B. *Anti-Cancer Drug Design*, SEVNTU PRESS, Sevastopol, 2002. P.23-30.
13. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al // *J. Amer. Chem. Soc.* 1995. V.117. P.5179.
14. The Protein Data Bank <http://www.pdb.org>
15. Jorgensen W.L., Chandrasekhas J., Madura J.D.,Impey R.W., Klein M.L. // *J. Chem. Phys.* 1983. V.79. P.926-935.
16. Наберухин Ю.И. // *Журн. структур. химии.* 1984. Т.25. С. 60-67.
17. Malenkov G.G., Tytik D.L., Zheligovskaya E.A. // *J. Mol. Liquids.* 1999.V. 82. P. 27-38.
18. Анищенко Д.Б., Березняк Е.Г., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. // *Вісн.Харьк.ун-ту, №560, Біофізичний вісник, вип.1(10).*2002. С.36-41.
19. Granonovsky Alex A., [www http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html](http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html)
20. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al // *J. Comput. Chem.* 1993. V. 14. P. 1347-1363.
21. Wang J., Wang W., Huo S., Lee M., Kollman P. A. // *J.Phys.Chem.* 2001.V. 105. P. 5055-5067.
22. Bodor N. , Gabanyi Z. , Wong C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V.111. P. 3783.
23. Baginski M., Fogolari F., Briggs J. M. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 274. P. 253-267.
24. Baginski M., Polucci P., Antonini I., Martelli S. // *J. Mol. Model.* 2002. V. 8. P. 24-32.
25. Kruglova E.B., Gladkovskaya N.A. XVI Intern.School-Seminar "Spectroscopy of molecules and crystals", 25.05-1.06.2003, Sevastopol, Books of Abs., P.46.
26. Анищенко Д.Б., Березняк К.Г., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. Тези доповідей III з'їзду Українського біофізичного товариства, Львів, 8-11 жовтня 2002, с.34.
27. Tao N.J., Lindsay S.M., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1988. V. 27. P. 1655-1671.
28. Tao N.J., Lindsay S.M., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1989. V. 28. P. 1019-1030.
29. Semenov M.A., Bereznyak E.G. // *J.Comments on Mol.Cell.Biophys.* 2000.V.1. N1. P.1-23.
30. Qu X., Chaires J. B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 2649-2650.
31. Qu X., Chaires J. B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 1-7.