

УДК 577.113:577.32

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ И СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСОВ САМОКОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ДЕЗОКСИГЕКСАНУКЛЕОТИДОВ 5'-d(GpCpApTpGpC) И 5'-d(GpCpTpApGpC) С АНТРАЦИКЛИНОВЫМ АНТИБИОТИКОМ ДАУНОМИЦИНОМ

В.В. Костюков, О.В. Рогова, М.П. Евстигнеев

Севастопольский национальный технический университет, 99053, Севастополь, Украина

Поступила в редакцию 30 июня 2006 г.

Методами 1М и 2М ^1H ЯМР-спектроскопии и молекулярной динамики исследовано комплексообразование антрациклинового антибиотика дауномицина с самокомплементарными дезоксигексануклеотидами 5'-d(GCATGC) и 5'-d(GCTAGC) в водно-солевом растворе. Определены равновесные термодинамические параметры и пространственные структуры комплексов дауномицина с гексамерами. Установлено, что сродство антибиотика к d(GCATGC) выше по сравнению с d(GCTAGC). На основании сравнительного анализа термодинамических и структурных параметров образования комплексов дуплексов гексамеров с антибиотиком сделан вывод о причинах различного сродства дауномицина к дуплексным формам дезоксигексануклеотидных последовательностей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дезоксигексануклеотид, d(GCATGC), d(GCTAGC), дауномицин, гидрофобные взаимодействия, ЯМР-спектроскопия, молекулярная динамика.

Дауномицин (DAU) является антибиотиком антрациклиновой группы, обладает выраженными противоопухолевыми свойствами и эффективен при лечении острой формы миелоидной лейкемии [1]. Химиотерапевтическое действие DAU связано с его способностью интеркалировать в ДНК и, тем самым, ингибировать репликацию ДНК и транскрипцию РНК.

Молекула DAU имеет плоский агликоновый хромофор в виде системы сопряженных шестичленных колец и положительно заряженное аминсахарное кольцо, ориентированное практически перпендикулярно хромофору (рис. 1).

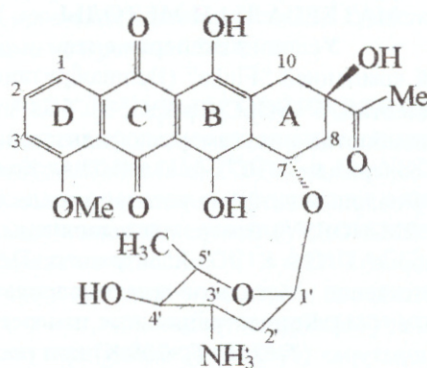


Рис. 1. Структурная формула молекулы дауномицина

В отличие от некоторых других интеркаляторов ДНК, DAU не проявляет выраженной специфичности к нуклеотидной последовательности [2], при этом имеющиеся данные о селективности связывания DAU с дезоксиолигонуклеотидами довольно противоречивы. Установлено, что антибиотик преимущественно связывается с полинуклеотидами, содержащими чередующиеся пурин-пиримидиновые (pur-pur) последовательности оснований [3]. Исследования связывания DAU с нативной ДНК в растворе [4] свидетельствуют о наличии G:C пар оснований на участках интеркаляции лиганда. Экспериментальные данные указывают также на то, что преимущественными местами связывания для DAU являются триплетные последовательности, содержащие две соседние G:C пары оснований, фланкированные A:T парой. Однако наличие A:T пары на конце триплета не является обязательным, поскольку для интеркаляции DAU допустимы также три последовательных G:C пары в цепи [5].

Теоретические исследования [6,7] также дают противоречивые результаты. Численное моделирование взаимодействия DAU с тетрамерным дуплексом ДНК [6] свидетельствует о преимущественной интеркаляции лиганда в rut-rut участки, при этом наиболее выгодное с энергетической точки зрения связывание DAU происходит с d(TpA) сайтами дезокситетрануклеотидов. С другой стороны, результаты численного анализа комплексообразования DAU с гексамерными дуплексами ДНК [7] показали, что мес-

тами преимущественного связывания DAU являются триплетные последовательности, содержащие два C:G или G:C участка.

Структурный и термодинамический анализ комплексообразования DAU с дуспиральными дезоксигексануклеотидами 5'-d(CGТАСG) и 5'-d(CGCGCG) был проведен в работе [8] методом 1М- и 2М-ЯМР спектроскопии в водно-солевом растворе. Установлено, что DAU преимущественно интеркалирует в концевой d(CpG) сайт каждого из гексануклеотидов, при этом аминокислотное кольцо антибиотика располагается в малой канавке гексамерных дуплексов, частично перекрывая третью пару оснований. Также было обнаружено преимущественное связывание антибиотика с триплетными участками нуклеотидной последовательности, содержащими две соседние C:G пары азотистых оснований, фланкированные А:Т парой в d(CGТАСG), по сравнению с триплетами, состоящими из трех последовательных C:G пар в случае дуплекса d(CGCGCG). Отметим, что встраивание антибиотика в терминальные сайты дуплексов наблюдалось и при изучении связывания DAU с дезокситетрануклеотидными последовательностями в растворе [9-11], а также при кристаллографических исследованиях комплексов антибиотика с дезоксигексануклеотидами [12-14]. Расчетные значения равновесных констант комплексообразования K_2 DAU с этими дуплексами составили $(6900 \pm 500) \cdot 10^3$ и $(2200 \pm 280) \cdot 10^3$ л/моль, соответственно. В то же время, исследование связывания антибиотика с самокомплементарным дезоксигексануклеотидом 5'-d(GCATGC) в аналогичных экспериментальных условиях [15] продемонстрировало значительно большее сродство DAU к данному гексамеру ($K_2 = (13000 \pm 3000) \cdot 10^3$ л/моль). Это позволяет утверждать о существовании сиквенс-специфичности связывания DAU с триплетными нуклеотидными последовательностями, при этом сродство антибиотика к триплетам убывает в ряду: 5'-d(GCA) > 5'-d(CGТ) > 5'-d(CGС) > 5'-d(ТАС).

В целом, проведенный обзор литературы показывает, что в настоящее время влияние третьей пары оснований на связывание с DAU в случае d(CpG) сайта посадки антибиотика исследовано достаточно подробно, в то время как ее роль в случае d(GpC) участка интеркаляции остается практически мало изученной. В настоящей работе методами 1М- и 2М-ЯМР спектроскопии (500 МГц) и молекулярной динамики (МД) проведено исследование комплексообразования DAU с самокомплементарным дезоксигексануклеотидом d(GCTAGC) и выполнен сравнительный анализ с изученным ранее [15] комплексом данного антибиотика с самокомплементарным гексамером d(GCATGC). Наличие идентичных терминальных d(GpC) сайтов в данных дезоксигексануклеотидах дает возможность определить влияние А:Т или Т:А пар оснований на особенности связывания DAU с триплетными участками олигомеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия эксперимента

Дауномицин, синтезированный компанией "Fluka" (Великобритания), использовался без дополнительной очистки. Дезоксигексануклеотид 5'-d(GpCpTpApGpC) был синтезирован компанией "Oswel DNA Service" (Великобритания). Антибиотик и гексамер лиофилизировали из 99.95 % D₂O и растворяли в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1, содержащем 10⁻⁴ моль/л ЭДТА. Концентрацию лиганда определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 11500$ л·моль⁻¹·см⁻¹ ($\lambda = 480$ нм) [16]. 1М- и 2М-ЯМР (2М-TOCSY, 2М-NOESY) измерения выполнены на спектрометре "Bruker DRX" (500 МГц) при температуре растворов $T = 298$ К и концентрациях DAU и гексамера, равных $D_0 = 1.9$ ммоль/л и $N_0 = 0.5$ ммоль/л, соответственно. Методики приготовления растворов и проведения ЯМР-эксперимента подробно описаны ранее [11]. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов DAU выполнены при двух температурах ($T_1 = 298$, $T_2 = 308$ К) при постоянной концентрации антибиотика 0.5 ммоль/л, концентрация гексамера изменялась в пределах от 0.1 до 1.2 ммоль/л. Температурные зависимости химических сдвигов протонов лиганда измерены в диапазоне температур от 310 до 352 К при концентрации гексамера $N_0 = 1.9$ ммоль/л и концентрации лиганда $D_0 = 0.5$ ммоль/л.

Молекулярная динамика

Расчет пространственных структур дуплексных форм дезоксигексануклеотидов d(GCATGC) и d(GCTAGC) и их комплексов с DAU выполнен при помощи программы X-PLOR, версия 3.851 с использованием силового поля CHARMM27. Для представления ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий использовались переключающая (switch) и сдвигающая (shift) функции, соответственно, с расстоянием усечения $r_{cut} = 12$ Å. Исходные конформации дуплексных форм дезоксигексануклеотидов соответствовали классической В-форме ДНК. Нуклеотидные цепи гексамеров, обозначенные как "А" и "В" (рис. 2), терминировались с 5'- и 3'-концов ОН-группами. Нейтрализация избыточных электрических зарядов фосфатов в гексамерах обеспечивалась ионами Na⁺, находящимися в стартовых конфигурациях на расстояниях 6 Å от атомов фосфора вдоль биссектрис углов O1P-P-O2P [17]. Водное окружение моделировали молекулами воды TIP3P, размещенными в кубическом боксе с ребром 35 Å. При совмещении центров масс водного бокса и гексамеров удалялись все молекулы воды, атомы кислорода которых находились на расстояниях, меньших 2,7 Å, от неводородных атомов ДНК, лиганда и ионов Na⁺. Для задания параметров атомных взаимодействий использованы кристаллографическая структура молекулы DAU [13] и величины электростатических взаимодействий

трических зарядов атомов лиганда, полученные в [18] на основе квантовомеханических расчетов. Молекула DAU встраивалась в терминальные сайты гексамеров, при этом аминокислотное кольцо размещалось в малой канавке дуплексов [8-15]. Концевая пара оснований G1(A) и C7(B) предварительно отодвигалась на 3.4 Å вдоль оси спирали с размещением на месте ее первоначального расположения хромофора антибиотика.

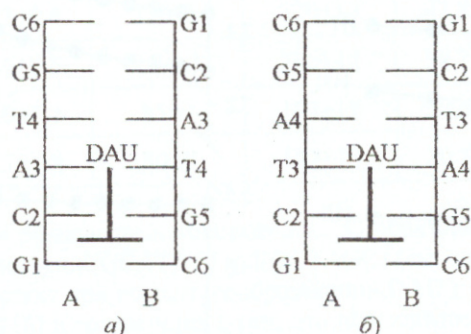


Рис. 2. Схемы интеркалированных комплексов дезоксигексануклеотидов d(GCATGC) (а) и d(GCTAGC) (б) с DAU

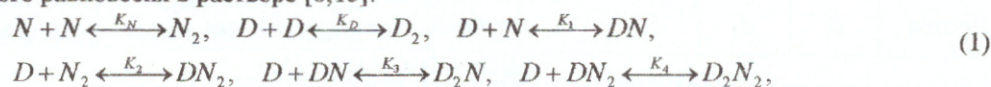
Оптимизация геометрии гексамеров и их комплексов с DAU осуществлялась путем минимизации потенциальной энергии молекулярной системы методом сопряженных градиентов. Диэлектрическая проницаемость среды принималась равной единице. На первом этапе минимизации фиксировались все атомы гексамеров, лиганда и ионы натрия для ускорения релаксации гидратного окружения к равновесному состоянию, второй этап минимизации проводился с фиксацией молекул гексануклеотидов. На окончательном этапе оптимизация геометрии проводилась без каких-либо ограничений на движение атомов в системе. После минимизации потенциальной энергии системы рассчитывалась МД по алгоритму Verlet при постоянной температуре $T=298$ К с временным шагом $\Delta t=2$ фс и ограничением тепловых движений атомов водорода по алгоритму Shake. Все молекулы воды, находящиеся на расстоянии менее 5 Å от граней водного бокса, фиксировались для исключения их вылета в вакуум. Свободная водная оболочка имела толщину ≈ 4 Å. Время эволюции комплексов составило 1 нс, координаты атомов записывались через 1 пс. Анализ геометрических и энергетических характеристик оптимизированных структур, а также их среднеквадратичных отклонений (СКО) в процессе МД проводился непосредственно средствами X-PLOR. Визуализация расчетных структур выполнялась с помощью программы VMD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспериментальных данных

Гомоядерная $2M-^1H$ ЯМР спектроскопия (2M-TOCSY и 2M-NOESY) использована для полного отнесения резонансов необменивающихся протонов в соответствии с известной методикой [19]. В отличие от комплексообразования DAU с другими дезоксигексануклеотидами [8], в 2M-NOE-спектрах смешанных растворов антибиотика с гексамерами d(GCATGC) и d(GCTAGC) не выявлено достаточно надежных межмолекулярных кросс-пиков между протонами лиганда и нуклеотида. Вместе с тем, на основании работ [8-15] сделано предположение о том, что наиболее вероятным местом интеркаляции DAU являются терминальные d(GpC)-сайты гексануклеотидных дуплексов.

Для расчёта параметров комплексообразования DAU с дезоксигексануклеотидом была использована модель молекулярного равновесия в растворе [8,15]:



где D и N - мономеры DAU и гексамера, K_N и K_D - равновесные константы димеризации антибиотика и гексануклеотидов, соответственно, $K_1 \dots K_4$ - равновесные константы образования 1:1 (DN), 1:2 (DN_2), 2:1 (D_2N) и 2:2 (D_2N_2) комплексов, соответственно. Константы димеризации DAU приняты равными 360 и 231 л/моль при 298 К и 308 К, соответственно [20].

Согласно схеме реакций (1), наблюдаемый химический сдвиг протонов антибиотика δ_{DAU} может быть представлен в виде [8,15]:

$$\delta_{DAU} = D/D_0 (\delta_m + 2\delta_D K_D D + \delta_1 K_1 N + \delta_2 K_2 K_N N^2 + 2\delta_3 K_1 K_3 ND + 2\delta_4 K_2 K_4 K_N N^2 D), \quad (2)$$

где δ_m и δ_D - протонные химические сдвиги антибиотика в мономерной и димерной формах, соответственно, $\delta_1 \dots \delta_4$ - предельные значения химических сдвигов протонов DAU в составе комплексов DN , DN_2 , D_2N и D_2N_2 , соответственно; D_0 - исходная концентрация лиганда. Для расчета равновесных констант комплексообразования DAU с дезоксигексануклеотидами и предельных значений химических сдвигов в составе комплексов $\delta_1 \dots \delta_4$ были измерены зависимости протонных химических сдвигов лиганда от концентрации олигонуклеотидов N_0 и температуры T смешанного раствора (рис. 3).

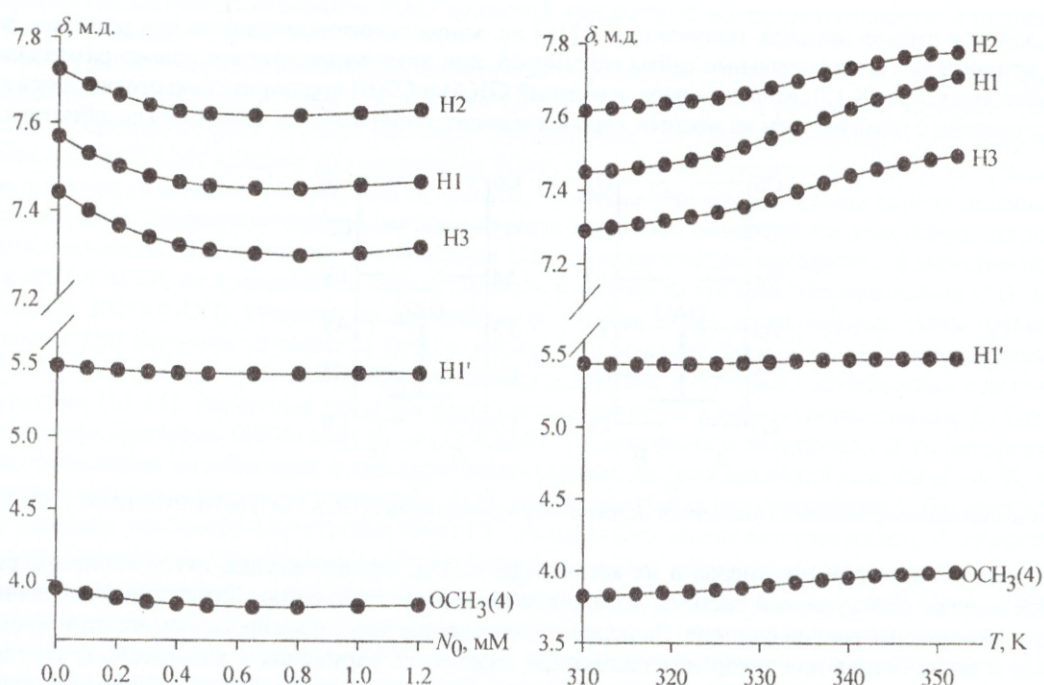


Рис. 3. Экспериментальные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов дауномицина в смешанном растворе с дезоксигексануклеотидом d(GCTAGC): а) от концентрации гексамера при $T=298$ К и концентрации лиганда $D_0=0.5$ ммоль/л; б) от температуры при концентрации гексамера $N_0=1.9$ ммоль/л и концентрации антибиотика $D_0=0.5$ ммоль/л

Расчетные структурные и термодинамические параметры исследуемых молекулярных комплексов определялись путем минимизации функции невязки, которая определяется как сумма квадратичных отклонений экспериментальных значений химических сдвигов $\delta_k^{\text{эксн}}$, измеренных в n точках, от их значений δ_k , рассчитанных по модели (1),(2), согласно выражению:

$$\Delta = \sum_{k=1}^n [\delta_k^{\text{эксн}} - \delta_k]^2 \quad (3)$$

Минимизацию функционала квадратичной невязки между экспериментальными и теоретическими значениями химических сдвигов протонов DAU проводили по восьми варьируемым параметрам $K_1 \dots K_4$ и $\delta_1 \dots \delta_4$, вычислительная процедура нахождения которых достаточно подробно описана в работе [21]. Результаты расчёта значений равновесных констант K_i (где $i=1, 2, \dots, 4$) образования различных типов комплексов DAU с гексамерами d(GCATGC) и d(GCTAGC) и значений δ_i представлены в табл. 1.

Таблица 1. Расчетные значения предельных протонных химических сдвигов и равновесных констант при комплексообразовании дауномицина с дезоксигексануклеотидами d(GCATGC) и d(GCTAGC) при температуре $T=298$ К в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1

Протон	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_m	$K_1,$ 10^3 л/моль	$K_2,$ 10^3 л/моль	$K_3,$ 10^3 л/моль	$K_4,$ 10^3 л/моль
d(GCATGC)+DAU [15]									
H2	7.82	7.60	7.47	7.28	7.83	139±30	13000±3000	55±15	16±15
H1	7.76	7.48	6.92	6.76	7.78				
H3	7.21	7.36	7.15	6.33	7.55				
H1'	4.52	5.47	5.04	5.34	5.52				
OCH ₃ (4)	3.97	3.79	3.65	3.86	4.02				
d(GCTAGC)+DAU									
H2	7.73	7.62	7.64	7.81	7.83	74±21	5060±1220	260±90	220±170
H1	7.61	7.40	7.41	7.89	7.78				
H3	7.42	7.28	7.34	7.57	7.55				
OCH ₃ (4)	3.97	3.82	3.81	4.01	4.02				

Расчет термодинамических параметров комплексообразования гексамера d(GCTAGC) с DAU проводился, как и ранее [21], на основании формализма Вант-Гоффа. Результаты расчетов представлены в табл. 2.

Термодинамический и структурный анализ комплексов...

Таблица 2. Термодинамические параметры комплексообразования дауномицина с дезоксигексануклеотидами d(GCATGC) и d(GCTAGC) в 0.1 М фосфатном буфере, рD 7.1

Реакция	d(GCATGC)+DAU [15]			d(GCTAGC)+DAU		
	$-\Delta G^0$, кДж/моль	$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S^0$, Дж/(моль·К)	$-\Delta G^0$, кДж/моль	$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S^0$, Дж/(моль·К)
$D + N \xrightleftharpoons{K_1} DN$	29.3±0.6	125±5	320±14	27.8±0.7	106±6	263±16
$D + N_2 \xrightleftharpoons{K_2} DN_2$	40.6±0.5	124±4	280±12	38.2±0.6	134±4	321±15
$D + DN \xrightleftharpoons{K_3} D_2N$	27.0±0.6	85±7	193±17	30.9±0.9	121±8	301±19
$D + DN_2 \xrightleftharpoons{K_4} D_2N_2$	23.7±1.8	80±9	187±23	30.5±1.9	95±9	216±21

Анализ расчетных значений равновесных констант $K_1...K_4$ образования 1:1, 1:2, 2:1 и 2:2 комплексов DAU с дезоксигексануклеотидами d(GCATGC) и d(GCTAGC) (см. табл. 1) показывает их качественное соответствие значениям констант при комплексообразовании DAU с ранее исследованными гексамерами d(CGTCAGC) и d(CGCGCG) [8] и согласуется с тем, что наблюдалось при связывании DAU с дезокситетрануклеотидами [9-11]. Так, вероятность образования 1:2 комплекса DAU с дуплексами гексамеров (K_2) гораздо больше, чем вероятность образования любых других комплексов антибиотик-гексануклеотид в водном растворе. Процесс встраивания второй молекулы DAU в гексамерные дуплексы в растворе имеет выраженный антикооперативный характер ($K_4 \ll K_2$), несмотря на наличие в гексамерных последовательностях двух триплетных участков – потенциальных мест связывания DAU с олигонуклеотидом. Последнее, вероятно, связано с особенностями комплексообразования молекулы дауномицина, содержащей массивное, положительно заряженное аминокислотное кольцо, которое создает определенные стерические препятствия присоединению к дуплексу гексамеров d(GCATGC)₂ и d(GCTAGC)₂ второй молекулы антибиотика. Отметим, что величина K_4 в случае d(GCATGC) на порядок ниже, чем в случае d(GCTAGC). Большая антикооперативность связывания со второй молекулой антибиотика для d(GCATGC) может быть вызвана более значительными искажениями конформации дуплекса данного гексамера при интеркаляции первой молекулы лиганда по сравнению со встраиванием в d(GCTAGC). Об этом свидетельствует и сравнительный анализ значений индуцированных химических сдвигов $\Delta\delta$ (табл. 1). Как видно, значения $\Delta\delta = \delta_m - \delta_4$ для 2:2 комплекса DAU с d(GCATGC) значительно выше, чем в случае d(GCTAGC). Это означает, что характер экранирования протонов, а, следовательно, и параметры интеркаляции второй молекулы антибиотика в дуплексы d(GCATGC) и d(GCTAGC) существенно различаются между собой.

Сравнение значений энтропий реакций комплексообразования DAU с гексамерами d(GCATGC) и d(GCTAGC) показывает (см. табл. 2), что связывание антибиотика с дуплексной формой d(GCATGC) энтропийно более выгодно. Учитывая значительно большее значение константы K_2 реакции комплексообразования DAU с d(GCATGC) по сравнению с реакцией DAU с d(GCTAGC) (см. табл. 2), можно предположить, что в стабилизации первого комплекса гидрофобные взаимодействия играют большую роль. В то же время, интеркаляция лиганда в дуплекс d(GCTAGC) сопровождается большим изменением энтальпии, т.е. энергетически более предпочтительным является встраивание DAU в данный гексамер. В конечном итоге, энтропийный фактор оказывается доминирующим, и абсолютная величина энергии Гиббса ΔG_2 , а, следовательно, и значение равновесной константы комплексообразования K_2 оказывается несколько больше при связывании антибиотика с дуплексом d(GCATGC). Указанные различия в энергетике комплексообразования DAU с исследуемым гексамером могут быть интерпретированы на основании анализа расчетных структур комплексов лиганд-олигонуклеотид.

Расчетные пространственные структуры комплексов

Расчетные пространственные структуры комплексов дезоксигексануклеотидных дуплексов с DAU, полученные в ходе МД, показаны на рис. 4.

Хромофор антибиотика расположен приблизительно посередине между парами оснований G1(A):C6(B) и C2(A):G5(B) почти параллельно им. При этом величина угла между продольными осями хромофора DAU и пары оснований C2(A):G5(B) для комплекса с d(GCATGC) составляет $\Psi \approx 57^\circ$, а в случае связывания с d(GCTAGC) $\Psi \approx 63^\circ$. Таким образом, по углу поворота хромофора DAU в сайтах интеркаляции данные комплексы отличаются незначительно. Обращает на себя внимание различие между значениями угла спирального вращения Ω между второй и третьей парами оснований дуплексов.

В то время как для шага C2pA3 гексамера d(GCATGC), согласно расчетам, $\Omega \approx 40^\circ$, для соответствующего шага C2pT3 гексамера d(GCTAGC) – $\Omega \approx 32^\circ$. Вероятно, такие особенности локального закручивания спиралей обусловлены параметрами вертикального стэкинга между основаниями в данных участках, поскольку известно, что интенсивность вертикальных взаимодействий убывает в ряду: $\text{pur-pur} > \text{pur-py} > \text{py-pur} > \text{py-py}$ [22].

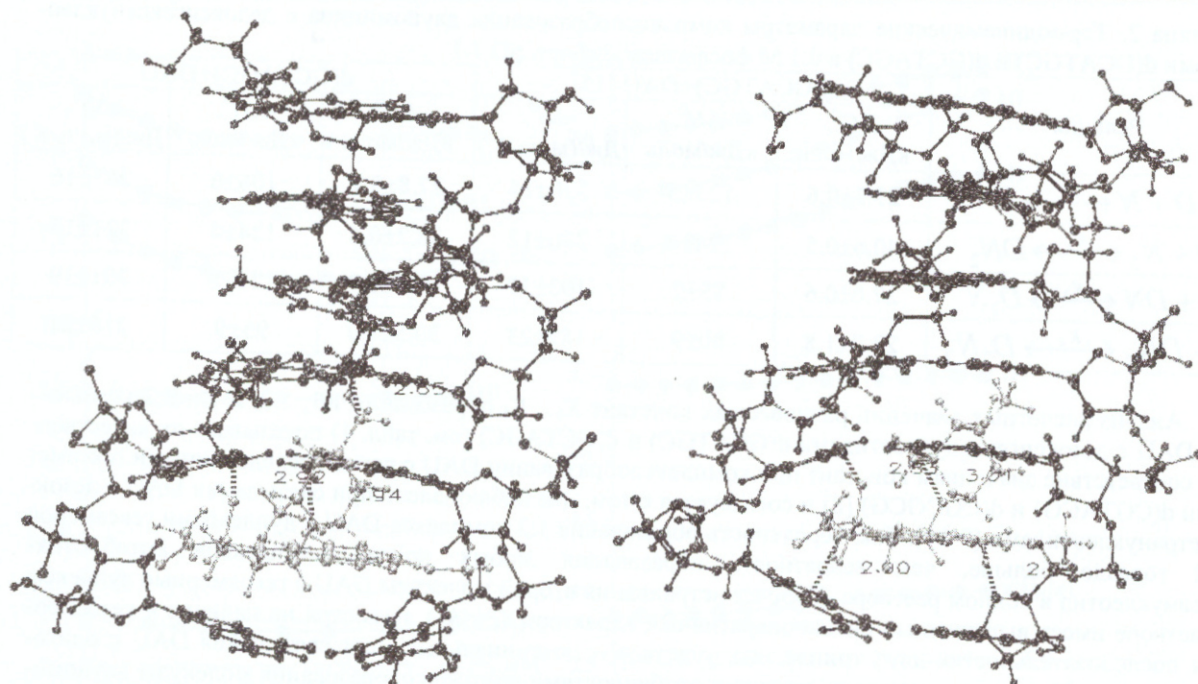


Рисунок 4 – Расчетные пространственные структуры комплексов дуплексных форм гексамеров d(GCATGC) и d(GCTAGC) с дауномицином. Водородные связи показаны пунктиром

Увеличение угла спирального вращения между второй и третьей парами оснований в комплексе DAU с d(GCATGC) приводит к сближению аминокислотного кольца антибиотика с сахаро-фосфатным остовом цепи А и образованию Н-связи между атомами O4'(T) и N3'(DAU). Более сильное закручивание третьей пары оснований d(GCATGC) относительно второй по сравнению с d(GCTAGC) имеет место не только в расчетных структурах комплексов с DAU, но и в случае дуплексов без встроенного лиганда: согласно расчетам, значения Ω для d(GCATGC) и d(GCTAGC) составляют 35° и 31°, соответственно. Таким образом, укладка аминокислотного кольца DAU в малую канавку дуплекса d(GCATGC) еще более увеличивает локальное закручивание спирали, в то время как для связывания лиганда с d(GCTAGC) – практически не изменяет. Это согласуется с более высокой антикооперативностью при связывании второй молекулы DAU и большими значениями индуцированных химических сдвигов в случае d(GCATGC) по сравнению с d(GCTAGC), упомянутыми выше (см. табл. 1). Поэтому можно утверждать, что по своим конформационным параметрам малая канавка d(GCTAGC) стерически более предпочтительна для взаимодействия с аминокислотным кольцом DAU, чем в случае d(GCATGC).

Особенности укладки аминокислотного кольца DAU в малую канавку ДНК при комплексообразовании во многом зависят от значения гликозидного угла антибиотика [23], определяемого по атомам C7–O7–C1'–C2' (см. рис. 1). Величина этого угла, согласно данным рентгеноструктурного анализа, может варьироваться в пределах 137.1°...161.6° [23], обуславливая значительную подвижность аминокислотного кольца DAU и, как следствие, различные варианты его укладки в малой канавке дуплекса ДНК. В данной работе при комплексообразовании лиганда с дуплексом гексамера d(GCATGC) величина гликозидного угла в расчетной структуре составила $\chi_{DAU} \approx 163^\circ$, а при связывании с d(GCTAGC) $\chi_{DAU} \approx 151^\circ$. По-видимому, «напряженное», нехарактерное значение χ_{DAU} в случае комплекса с d(GCATGC) обусловлено, главным образом, стерическими препятствиями со стороны атомов малой канавки этого дуплекса при укладке аминокислотного кольца DAU. Таким образом, согласно расчетам, стерически более выгодным оказывается взаимодействие аминокислотного кольца антибиотика с малой канавкой дуплекса d(GCTAGC) по сравнению с d(GCATGC). Укладка аминокислотного кольца лиганда в определенной мере влияет и на положение хромофора в сайте интеркаляции. Так, для комплекса DAU с d(GCATGC) наблюдается смещение (на ≈ 0.4 Å) хромофора антибиотика в сторону цепи А по сравнению с d(GCTAGC).

Известно, что между определенными электроотрицательными атомами DAU и дезоксирибонуклеотида в зависимости от конформации комплекса могут образовываться различные водородные связи. Так, при теоретическом исследовании интеркаляции DAU в CGA сайт дуплекса самокомплементарного 14-мера в (CGCGCGATCGCGCG)₂ при величине гликозидного угла антибиотика 59° наблюдалось образование трех водородных связей (O4'(G) – N3'(DAU), O5'(G) – N3'(DAU), O1P(G) – O9(DAU)), при значении 137° – двух (O4'(C) – N3'(DAU), O2(T) – N3'(DAU)), и при 159° – одной Н-связи (O4'(T) – N3'(DAU)) [23]. В настоящей работе, согласно расчетам, при комплексообразовании d(GCATGC) с DAU имеет место формирование трех Н-связей: O2(C2) – O9(DAU), N2(G5) – O7(DAU) и O4'(T) – N3'(DAU). В случае

связывания лиганда с d(GCTAGC) наблюдается образование четырех Н-связей: O2(C2) – O9(DAU), N2(G5) – O7(DAU), N3(G1) – O11(DAU) и O4'(C6) – O6(DAU). Таким образом, положение хромофора DAU примерно на оси спирали дуплекса d(GCTAGC) обеспечивает формирование двух Н-связей между хромофором антибиотика сайтом интеркаляции. В то же время, более тесный контакт аминокислотного кольца DAU с остовом цепи А дуплекса d(GCATGC), как упоминалось выше, приводит к образованию одной Н-связи (см. рис. 4).

Энергетический анализ расчетных структур. Значения энергий взаимодействий в расчетных структурах дуплексных форм дезоксирибонуклеотидов d(GCATGC) и d(GCTAGC), а также в их комплексах с DAU представлены в табл. 3.

Таблица 3. Расчетные значения энергий взаимодействий в дуплексных формах дезоксирибонуклеотидов d(GCATGC) и d(GCTAGC) и их комплексах с дауномицином

Взаимодействие	d(GCATGC)	d(GCTAGC)	d(GCATGC)+DAU	d(GCTAGC)+DAU
Внутри гексамера	-1395.2	-1370.5	-1317.3	-1300.2
Между нитями	-143.6	-124.1	-160.4	-140.0
Внутри нити А	-627.0	-622.4	-572.9	-574.1
В остове нити А	139.6	162.2	168.7	167.5
Между основаниями нити А	-620.8	-622.9	-596.1	-601.7
G1 и C2	-21.7	-18.7	-0.9	-2.2
C2 и A3(T3)	-4.0	-7.8	-2.4	-8.2
A3 и T4 (T3 и A4)	-9.0	-7.7	-7.6	-7.3
T4 и G5 (A4 и G5)	-7.7	-9.6	-8.8	-7.7
G5 и C6	-18.8	-20.9	-18.3	-19.9
Внутри нити В	-624.6	-624.0	-584.0	-586.1
В остове нити В	146.2	149.4	165.0	164.9
Между основаниями нитей	-123.7	-108.0	-135.5	-118.1
G1(A) и C6(B)	-26.1	-26.2	-25.0	-24.0
C2(A) и G5(B)	-25.5	-25.7	-25.7	-25.4
A3(A) и T4(B) (T3(A) и A4(B))	-13.8	-14.2	-14.1	-13.2
T4(A) и A3(B) (A4(A) и T3(B))	-14.1	-14.1	-14.0	-14.0
G5(A) и C2(B)	-25.6	-26.2	-24.6	-25.4
C6(A) и G1(B)	-24.1	-24.1	-25.8	-26.1
Гексамера с водой	-1573.3	-1725.4	-1288.2	-1418.9
DAU с гексамером	-	-	-203.1	-167.6
АС кольца DAU с гексамером	-	-	-243.8	-210.5
Хромофора DAU с гексамером	-	-	40.7	43.0
DAU с водой	-	-	-93.2	-152.0

Как видно, встраивание лигандов не приводит к существенному изменению энергии внутримолекулярных взаимодействий в обоих дуплексах. В то же время, абсолютные значения энергий межнитевых взаимодействий несколько увеличиваются, что соответствует известному факту повышения температуры плавления дезоксирибонуклеотидных дуплексов при связывании с интеркаляторами [2]. Так, согласно проведенным нами расчетам, величина температуры плавления комплекса дуплекса d(GCATGC) с DAU составляет $T_m=328.8$ К, в то время как для гексамера без лиганда она равна 322.7 К [24]. В случае комплекса с данным антибиотиком дезоксирибонуклеотида d(GCTAGC) соответствующие величины оказались равными 321.5 и 311.6 К. Имеет место увеличение энергии взаимодействия в остовах нитей обоих дуплексов d(GCATGC) в силу увеличения их "напряженности" при интеркаляции DAU. Интенсивность взаимодействий между основаниями, кроме входящих в сайты интеркаляции, для обеих расчетных структур комплексов изменяются незначительно. Отметим, что значения энергий взаимодействий во всех парах оснований также почти не изменяется. Даже в терминальных парах G1(A) – C6(B) интеркаляция антибиотика практически не ослабляет водородных связей в них. Встраивание антибиотика в d(GpC) сайт дуплекса d(GCATGC) оказывается энергетически более выгодным при взаимодействии с олигонуклеотидом как аминокислотного кольца, так и хромофора лиганда по сравнению со связыванием с d(GCTAGC). При этом интеркаляция лиганда существенно уменьшает абсолютные величины энергий взаимодействия дуплексов с водным окружением (см. табл. 3). Отметим, однако, что неинтеркалированный дуплекс d(GCTAGC), согласно расчетам, проявляет большую гидрофильность. При встраивании DAU в дуплексы d(GCATGC) и d(GCTAGC) абсолютные значения энергий взаимодействия гексамеров с

водой уменьшаются на ≈ 285 и ≈ 307 ккал/моль, соответственно. Более близкий контакт гидрофильного аминокислотного кольца DAU с остовом цепи А гексамера d(GCATGC) приводит к значительно большему уменьшению абсолютного значения энергии взаимодействия молекулы интеркалированного антибиотика с водой по сравнению со встраиванием в дуплекс d(GCTAGC). В целом, согласно расчетам, энергетически более выгодной оказывается реакция комплексообразования антибиотика с d(GCTAGC), поскольку сумма энергий внутри- и межмолекулярных взаимодействий в системе «d(GCATGC)+DAU+растворитель» оказывается равной ≈ -2900 ккал/моль, в то время как в случае связывания лиганда с d(GCTAGC) она составила ≈ -3038 ккал/моль. Это согласуется с большим значением энтальпии реакции лиганда с дуплексом d(GCTAGC) (см. табл. 2), найденным из ЯМР-эксперимента. При этом в первой системе более выгодными являются контакты между DAU и гексамером и внутри гексамера, а для второй – водного окружения с дезоксирибонуклеотидом и антибиотиком. Вероятно, уменьшение гидратации атомов как малой канавки d(GCATGC), так и аминокислотного кольца антибиотика, сопровождающееся вытеснением молекул воды из их ближайшей гидратной оболочки в раствор, обуславливает большее значение энтропии реакции комплексообразования DAU с d(GCATGC) по сравнению с d(GCTAGC), полученное в ЯМР-эксперименте (см. табл. 2). При этом подвижность гексамеров и молекулы антибиотика в обоих комплексах, оцененная по значениям СКО, приблизительно одинакова (табл. 4), поэтому отличие в значениях энтропий реакций образования комплексов не обусловлены различиями в их конформационной подвижности.

Таблица 4 – Значения среднеквадратичных отклонений структурных элементов комплексов дуплексных форм гексамеров d(GCATGC) и d(GCTAGC) с DAU по неводородным атомам за последние 40 пс молекулярной динамики

Структурный элемент	d(GCATGC)+DAU	d(GCTAGC)+DAU
Весь гексамер	0.439	0.445
Нить А	0.437	0.437
Остов нити А	0.455	0.466
Основания нити А	0.416	0.406
Нить В	0.441	0.453
Остов нити В	0.467	0.485
Основания нити В	0.412	0.418
DAU	0.353	0.385

Отметим, что энтропийно выгодные гидрофобные взаимодействия аминокислотного кольца DAU в малой канавке двойной спирали ДНК играют существенную роль и при комплексообразовании DAU с ранее изученными гексамерами [8]. Вероятно, укладка аминокислотного кольца антибиотика в малую канавку В-формы ДНК значительно нарушает упорядоченную структуру молекул воды в ней, известную как “хребет гидратации” [25].

ВЫВОДЫ

В настоящей работе установлено, что сродство DAU к дуплексу самокомплементарного гексамера d(GCATGC) оказывается выше по сравнению с дуплексной формой изомерного дезоксирибонуклеотида d(GCTAGC). Показано, что реакция комплексообразования лиганда с d(GCATGC) энтропийно более выгодна по сравнению со связыванием с d(GCTAGC). Это обусловлено повышенным локальным закручиванием дуплекса d(GCATGC) и особенностями укладки аминокислотного кольца DAU в малую канавку ДНК, что приводит к большему вытеснению молекул воды из ближайшей гидратной оболочки атомов канавки гексамера и аминокислотного кольца антибиотика в раствор при интеркаляции. В то же время, энтальпийно более выгодной является реакция связывания DAU с d(GCTAGC), что связано с повышенной гидрофильностью этого комплекса. Однако для исследованных комплексов гидрофобный (энтропийный) фактор оказывается преобладающим.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arcamone F., Penco S. Anthracyclines and Anthracenedione - based Anticancer Agents. Ed. J.W. Lown.-N.Y.: Elsevier, 1988.-125 p.
2. Neidle S., Abraham Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acids // *CRC Crit Rev Biochem.*-1984.-V. 17, N 1.-P. 73-121.
3. Chaires J.B. Equilibrium studies on the interaction of daunomycin with deoxypolynucleotides // *Biochemistry.*-1983.-V. 22, N 18. -P. 4204-4211.
4. Chaires J.B., Dattagupta N., Crothers D. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid // *Biochemistry.*-1982.-V. 21.-P. 3933-3940.
5. Chaires J.B., Fox K.R., Herrera J.E., Britt M., Waring M.J. Site and sequence specificity of the daunomycin - DNA interaction // *Biochemistry.*-1987.-V. 27.-P. 8227-8236.
6. Newlin D.D., Miller K.J., Pilch D.F. Interactions of molecules with nucleic acids. VII. Intercalation and T-A specificity of daunomycin in DNA // *Biopolymers.*-1984.-V. 23, N 1. -P. 139-158.
7. Chen K.X., Gresh N., Pullman B. A theoretical investigation on the sequence selective binding of daunomycin to double-stranded polynucleotides // *J. Biomol. Struct. Dyn.*-1985.-V. 3, N. 3.-P.445-466.
8. Веселков А.Н., Итон Р.Дж., Пахомов В.И., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б. Структурный и термодинамический анализ связывания антибиотика дауномицина с дезоксигексануклеотидами различной последовательности оснований в цепи методом ЯМР спектроскопии // *Журн. структур. химии.*-2001.-Т.42, № 2. -С. 236-250.
9. Итон Р.Дж., Веселков Д.А., Пахомов В.И., Барановский С.Ф., Болотин П.А., Осетров С.Г., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. Исследование сиквенс-специфичности комплексообразования антибиотика дауномицина с изомерными дезокситетрануклеотидами 5'-d(ACGT), 5'-d(AGCT) и 5'-d(TGCA) методом ЯМР-спектроскопии // *Молекуляр. биология.* - 1999. - Т. 33, №5. - С. 803-813.
10. Веселков А.Н., Итон Р.Дж., Барановский С.Ф., Осетров С.Г., Болотин П.А., Дымант Л.Н., Пахомов В.И., Дэвис Д.Б. Комплексообразование антибиотика дауномицина с дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатом 5'-d(CpGpCpG) в водном растворе // *Журн. структур. химии.*-1999.-Т. 40.-С. 276-286.
11. Davies D.B., Eaton R.J., Baranovsky S.F., Veselkov A.N. NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution // *J. Biomol. Str. Dyn.*-2000.-V. 17, N 5.-P. 887-901.
12. Wang A.H., Ughetto G., Quigley G.J., 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, N. 4.-P. 1152-1163.
13. 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, N 10.-P. 2538-2549.
14. Nunn C.M., Van Meervelt L., Zhang S., Moore M.H., Kennard O. DNA-drug interactions-the crystal structures of d(TGTACA) complexed with daunomycin // *J. Mol. Biol.*-1991.-V. 22, N 2.-P. 167-177.
15. Pahomov V.I., Rogova O.V., Volynkin V.S., Veselkov K.A., Hernandez Santiago A.A., Semanin A.V., Djimant L.N., Veselkov A.N. Distinctive features of complexation of anthracycline antibiotic daunomycin with deoxyhexanucleotide d(GCATGC) in aqueous solution: 1D- and 2D-NMR analysis // *SPIE Proceeding.*-2004.-V. 5507.-P. 333-341.
16. Chaires J.B., Dattagupta N., Crothers D. Self-association of daunomycin // *Biochemistry.*-1982.-V. 21.-P. 3927-3932.
17. Ravishanker G., Auffinger P., Langley D. R., Jayaram B., Young M. A., Beveridge D. L. Treatment of Counterions in Computer Simulations of DNA // *Rev. in Comp. Chem.*-1997.-V. 11.-P. 317-372.
18. Cieplak P., Rao S.N., Grootenhuys P.D.J., Kollman P.A. Free Energy Calculation on Base Specificity of Drug-DNA Interactions: Application to Daunomycin and Acridine Intercalation into DNA // *Biopolymers.*-1990.-V. 29.-P. 717-727.
19. Wijnendga S.S., Mooten M.W., Hilbers S.W. NMR of nucleic acids: from spectrum to structure. NMR of macromolecules. A practical approach. Ed. G.C.K. Roberts. Oxford: IRL Press.-1993.-437 p.
20. Итон Р.Дж., Веселков Д.А., Барановский С.Ф., Осетров С.Г., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. Исследование самоассоциации молекул антрациклиновых антибиотиков в водном растворе методом ¹H-ЯМР-спектроскопии // *Хим. физика.*-2000.-Т.19, № 2.- С. 98-104.
21. Veselkov A.N., Karawajew L., Davies D.B. 1H NMR Structural analysis of Ethidium Bromide Complexation with Self-Complementary Deoxytetranucleotides 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-(TpGpCpA) in Aqueous Solution // *Biopolymers.* - 1996. - V.38. - P.745-757.
22. Ts'o P.O.P. Bases, nucleosides, and nucleotides. In *Basic Principles of Nucleic Acid Chemistry*. N.Y.: Academic Press.-1974.-P. 454-584.
23. Trieb M., Rauch C., Wellenzohn B., Wibowo F., Loerting T., Mayer E., Liedl K.R. Daunomycin Intercalation Stabilizes Distinct Backbone Conformations of DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.*-2004.-V. 21, N 5.-P. 713-723.
24. Веселков А.Н., Пахомов В.И., Рогова О.В., Волынкин В.С., Дымант Л.Н., Итон Р.Дж., Дэвис Д.Б. ¹H ЯМР-исследование самоассоциации молекул дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) в водном растворе // *Биофизика.* 2004.-Т. 49, № 5.-С. 781-788.
25. Kopka M. L., Fratini A. V., Drew H. R. Dickerson R. E. Ordered water structure around a B-DNA dodecamer. A quantitative study // *J. Mol. Biol.*-1983.-V. 163.-P. 129-146.