

УДК 577.113:577.32

**ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЙ ВКЛАД В ЭНЕРГИЮ  
КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ АНТИОПУХОЛЕВЫХ  
АНТИБИОТИКОВ С ДНК****В.В. Костюков, Н.М. Хомутова, М.П. Евстигнеев***Севастопольский национальный технический университет, 99053, Севастополь, Украина*

Поступила в редакцию 14 февраля 2008 г.

Проведено исследование электростатических взаимодействий при комплексообразовании актиномицина D, дауномицина, новантрона и ногаламицина с олигонуклеотидными дуплексами, содержащими от 4 до 16 пар оснований. Выполнен анализ основных составляющих электростатической энергии. Изучено влияние длины двойной спирали ДНК на энергию электростатических взаимодействий. Показано, что результаты расчетов для дуплексов ДНК с 8 и более парами оснований хорошо согласуются между собой. Установлена корреляция между изменениями значений угла спирального вращения и электростатических взаимодействий при интеркаляционном раскручивании сайта встраивания, а также сходное для всех антибиотиков изменение электростатической энергии взаимодействий в дуплексе ДНК. В то же время, межмолекулярные электростатические взаимодействия нейтральных молекул актиномицина D и новантрона с олигомерами ДНК существенно отличаются от таковых для связывания с ДНК положительно заряженных дауномицина и ногаламицина. Показано, что, в целом, электростатические взаимодействия препятствуют комплексообразованию всех четырех рассмотренных антиопухолевых антибиотиков с ДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ароматические антиопухолевые антибиотики, электростатический вклад в энергию комплексообразования, нелинейное уравнение Пуассона-Больцмана.

Многие биологически активные ароматические соединения (БАС) являются эффективными препаратами для лечения различных заболеваний, в первую очередь, онкологических, и широко используются в клинической практике [1]. Действие большинства из них основано на интеркаляционном связывании с ДНК в клетке с последующим ингибированием процессов репликации и транскрипции [2]. В связи с этим, исследование взаимодействия ароматических антибиотиков с ДНК имеет большое значение как для понимания механизма их действия, так и для создания новых, более эффективных препаратов [3].

При исследовании межмолекулярных взаимодействий в растворе важную роль играет знание физических факторов, ответственных за стабилизацию комплексов, и их относительных вкладов в полную свободную энергию комплексообразования  $\Delta G_{\text{экс}}$ , наблюдаемую в эксперименте. Согласно [4,5], основными составляющими измеряемой величины  $\Delta G_{\text{экс}}$  в водно-солевом растворе являются гидрофобные, электростатические, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, водородные связи, а также энтропийный вклад от изменения поступательных, вращательных и колебательных степеней свободы молекул и высвобождения противоионов при образовании комплексов.

Электростатическая составляющая  $\Delta G_{\text{эл}}$  является одной из наиболее важных при комплексообразовании биомолекул. Она включает в себя внутри- и межмолекулярные кулоновские взаимодействия парциальных атомных зарядов, взаимодействие с индуцированными зарядами гидратной оболочки (обусловленными поляризацией водного окружения зарядами атомов растворенных веществ) и взаимодействие с противоионами [6,7]. При этом роль электростатических взаимодействий при связывании ароматических антиопухолевых антибиотиков с ДНК остается мало изученной. В настоящее время анализ  $\Delta G_{\text{эл}}$  выполнен только для дауномицина и его производных [8]. В ряде работ, посвященных анализу вкладов различных энергетических компонент в суммарную

энергию взаимодействия БАС с ДНК, рассмотрена лишь полиэлектролитная составляющая электростатической энергии [4,9 и ссылки в них].

В настоящей работе методом, основанным на решении нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана, впервые произведен расчет и сравнительный анализ электростатической составляющей суммарной энергии комплексообразования ароматических антиопухолевых антибиотиков актиномицина D (AMD), дауномицина (DAU), ногаламицина (NOG) и новантрона (NOV) с олигомерами ДНК различной длины (от 4 до 16 пар оснований).

Актиномицин D (рис. 1а) ингибирует транскрипцию ДНК при интеркаляции феносазонового хромофора между азотистыми основаниями. При этом два массивных пентапептидных кольца располагаются в малой канавке дуплекса ДНК [10]. Дауномицин (даунорубин, см. рис. 1б) относится к антибиотикам антрациклинового ряда и эффективен при лечении лейкемии [1]. Молекула DAU имеет агликоновый хромофор, состоящий из четырех сопряженных колец, и положительно заряженное аминсахарное кольцо (даунозамин). При встраивании агликона между парами оснований аминсахарное кольцо укладывается в малую канавку дуплекса ДНК [3]. В молекуле антрациклинового антибиотика ногаламицина (см. рис. 1в) с одной стороны хромофора находится положительно заряженное бициклическое аминсахарное кольцо, а с другой – нейтральная сахарная группа (ногалоза), которая при интеркаляции агликона в двойную спираль ДНК локализуется в малой канавке, а бициклический аминсахар – в большой [10]. Новантрон (митоксантрон, см. рис. 1г) является антрацендионовым антибиотиком и эффективен при лечении лейкемии и лимфолейкоза [1]. Хромофор NOV встраивается в ДНК преимущественно со стороны большой канавки дуплекса, а боковые аминсахарные цепи участвуют в электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с поверхностью молекулы ДНК [3].

## МЕТОДЫ

Для расчета электростатической энергии биомолекул и их комплексов в водно-солевом растворе в настоящей работе использован метод, основанный на решении нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана (НУПБ) методом конечных разностей при неявном задании водно-солевого окружения [6-8].

Полная электростатическая энергия Гиббса  $\Delta G_{эл}$  молекулы в водном растворе в присутствии одновалентных ионов соли может быть определена из НУПБ [6,7]:

$$\nabla[\varepsilon(\vec{r})\nabla\varphi(\vec{r})] - \frac{8\pi e^2 I}{kT} \sinh[\varphi(\vec{r})] + \frac{4\pi e \rho_\phi(\vec{r})}{kT} = 0, \quad (1)$$

где  $\varphi$  – электростатический потенциал в данной точке в единицах  $kT/e$ ;

$k$  – постоянная Больцмана;

$T$  – абсолютная температура;

$\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды;

$\rho_\phi$  – плотность фиксированных зарядов, т.е. зарядов данной молекулы;

$I$  – макроскопическая ионная сила раствора (вдали от данной молекулы);

$\vec{r}$  – радиус-вектор данной точки.

Для системы, моделируемой с помощью НУПБ, было показано [11], что величина  $\Delta G_{эл}$  может быть вычислена путем объемного интегрирования по всему пространству:

$$\Delta G_{эл} = \iiint_{\infty} \left\{ \frac{\rho_\phi \varphi_\phi}{2} + \rho_\phi \varphi_m + \frac{\rho_m \varphi_m}{2} - (\rho_m \varphi + kTc[2 \cosh(\varphi) - 2]) \right\} dV, \quad (2)$$

где  $\varphi_\phi$  и  $\varphi_m$  – потенциалы, создаваемые фиксированными и подвижными (ионными) зарядами, соответственно, при этом  $\varphi_\phi + \varphi_m = \varphi$ ;

## Электростатический вклад в энергию комплексообразования ...

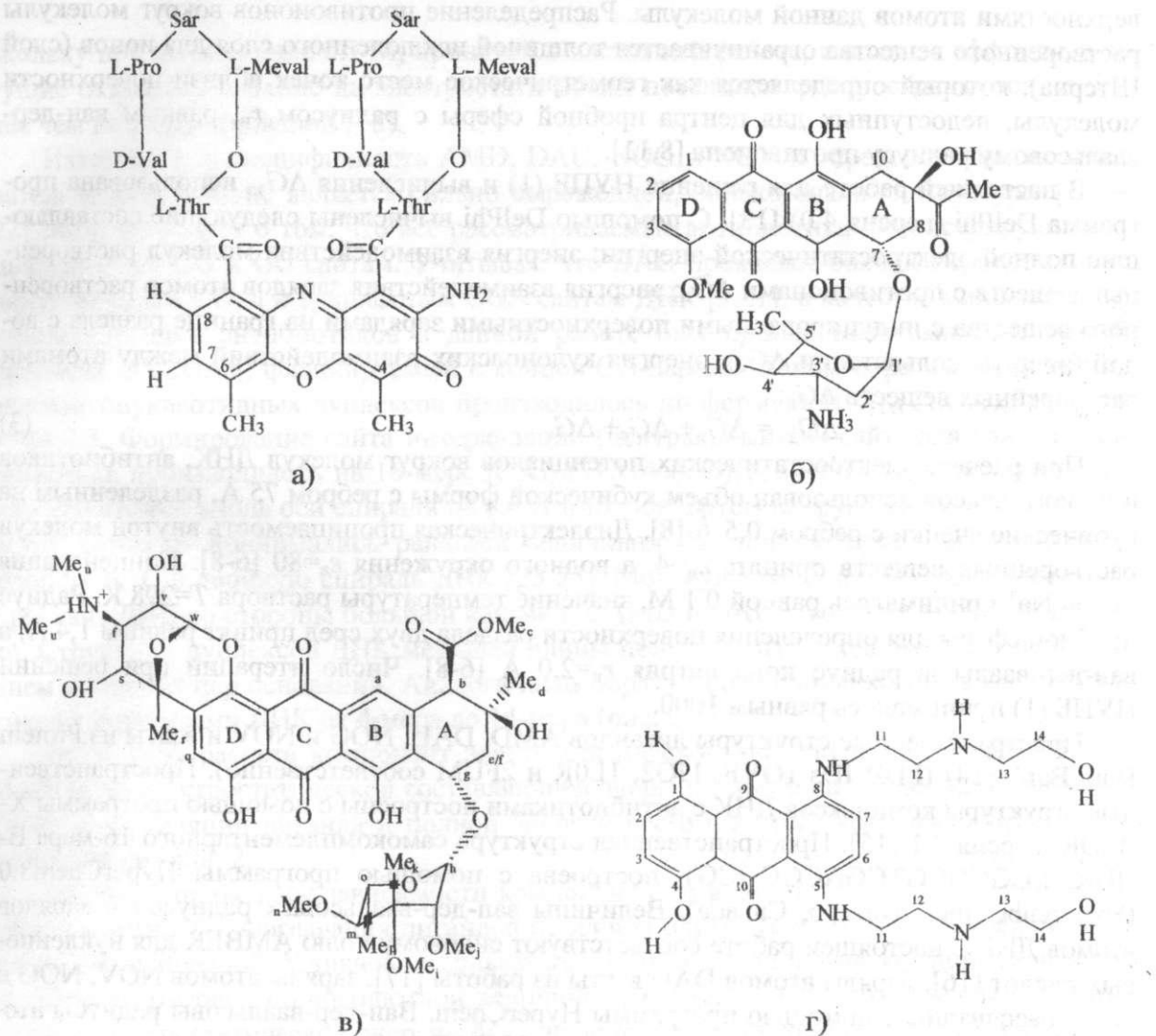


Рис. 1. Структурные формулы исследованных ароматических антиопухолевых антибиотиков: актиномицина D (а), дауномицина (б), ногаламицина (в) и новантрона (г)

$c$  – концентрация соли;

$\rho_M$  – плотность подвижных зарядов.

Таким образом, для вычисления значения  $\Delta G_{эл}$  при помощи интеграла (2) требуется из НУПБ (1) найти электростатический потенциал  $\phi$  в каждой точке пространства. На практике, при решении (1) методом конечных разностей расчет  $\phi$  проводится внутри определенного объема, как правило, кубической формы, достаточно большого для того, чтобы его границы несущественно нарушали распределение потенциалов на границе раздела молекулы растворенного вещества и воды. Весь объем моделируемой системы разделяется на ячейки, настолько малые, что значение  $\phi$  внутри каждой ячейки можно считать с заданной точностью постоянным [8,11].

Водно-солевое окружение в методе НУПБ задается неявно. Молекула растворенного вещества в рамках данной модели представляется в виде полости с малой величиной  $\epsilon_n$ , отделенной от водного окружения (среды с высоким значением диэлектрической проницаемости  $\epsilon_v$ ) доступной для растворителя поверхностью (solvent accessible surface) [12]. Поверхность молекулы растворенного вещества, доступная для растворителя (воды), определяется, согласно [12], как геометрическое место центра пробной сферы с радиусом, равным ван-дер-ваальсовому радиусу атома кислорода молекулы воды (1.4 Å) при ее движении по поверхности, ограниченной ван-дер-ваальсовыми по-

верхностями атомов данной молекулы. Распределение противоионов вокруг молекулы растворенного вещества ограничивается толщиной исключенного слоя для ионов (слой Штерна), который определяется как геометрическое место точек вблизи поверхности молекулы, недоступных для центра пробной сферы с радиусом  $r_n$ , равным ван-дер-ваальсовому радиусу противоиона [8,11].

В настоящей работе для решения НУПБ (1) и вычисления  $\Delta G_{эл}$  использована программа DelPhi (версия 4.0) [13]. С помощью DelPhi вычислены следующие составляющие полной электростатической энергии: энергия взаимодействия молекул растворенных веществ с противоионами  $\Delta G_n$ ; энергия взаимодействия зарядов атомов растворенного вещества с индуцированными поверхностными зарядами на границе раздела с водой (энергия сольватации  $\Delta G_c$ ); энергия кулоновских взаимодействий между атомами растворенных веществ  $\Delta G_k$ :

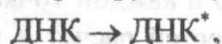
$$\Delta G_{эл} = \Delta G_n + \Delta G_c + \Delta G_k. \quad (3)$$

При расчете электростатических потенциалов вокруг молекул ДНК, антибиотиков и их комплексов использован объем кубической формы с ребром 75 Å, разделенным на кубические ячейки с ребром 0,5 Å [8]. Диэлектрическая проницаемость внутри молекул растворенных веществ принята  $\epsilon_n=4$ , а водного окружения  $\epsilon_w=80$  [6-8]. Концентрация ионов  $Na^+$  принималась равной 0.1 М, значение температуры раствора  $T=298$  К. Радиус пробной сферы для определения поверхности раздела двух сред принят равным 1,4 Å, а ван-дер-ваальсов радиус иона натрия  $r_n=2,0$  Å [6-8]. Число итераций при решении НУПБ (1) принималось равным 1000.

Пространственные структуры лигандов AMD, DAU, NOG и NOV и взяты из Protein Data Bank [14] (PDB IDs 1OVF, 1JO2, 1L0R и 2FUM соответственно). Пространственные структуры комплексов ДНК с антибиотиками построены с помощью программы X-PLOR, версия 3.1 [15]. Пространственная структура самокомплементарного 16-мера В-ДНК  $d(CGCGCGTCGACGCGCG)_2$  построена с помощью программы HyperChem8.0 (Hypercube, Inc., Toronto, Canada). Величины ван-дер-ваальсовых радиусов и зарядов атомов ДНК в настоящей работе соответствуют силовому полю AMBER для нуклеиновых кислот [16]. Заряды атомов DAU взяты из работы [17], заряды атомов NOV, NOG и AMD рассчитаны с помощью программы HyperChem. Ван-дер-ваальсовы радиусы атомов антибиотиков также соответствуют полю AMBER.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование интеркаляторов с ДНК может быть проанализировано как процесс, состоящий из двух этапов: образование интеркаляционной полости в дуплексе ДНК (т.е. переход спирали ДНК из В-формы в раскрученную (unwound) ДНК\*), и встраивание лиганда в раскрученную ДНК [8]:



Энергетические эффекты обоих этапов комплексообразования (раскручивание спирали ДНК и встраивание в нее БАС) имеют электростатическую составляющую, при этом суммарный электростатический вклад  $\Delta G_{эл}$  может быть представлен как

$$\Delta G_{эл} = \Delta G_p + \Delta G_b, \quad (5)$$

где  $\Delta G_p$  и  $\Delta G_b$  – вклады раскручивания В-ДНК и интеркаляции в нее молекулы БАС, соответственно. Каждый из этих вкладов, в свою очередь, рассчитывается как сумма трех составляющих (3).

С целью подбора оптимальной для проведения расчетов длины фрагмента в настоящей работе использованы олигомеры, содержащие от 4 до 16 пар оснований. Дальнейшее увеличение длины последовательности не представляется целесообразным, по-

скольку при ионной силе 0.1 М, принятой в настоящей работе, концевые эффекты, могущие оказывать влияние на электростатический потенциал, распространяются не более чем на 5 пар оснований [18].

Известно, что специфичность AMD, DAU, NOG и NOV к определенным последовательностям ДНК не является сильно выраженной, однако анализ литературы [3,19-22] свидетельствует о том, что все рассматриваемые антибиотики демонстрируют специфичность с CG и GC сайтам. Учитывая, что DAU проявляет большее сродство не к динуклеотидам CG, а к триплетным CGA сайтам ДНК [3,21], в качестве минимального участка посадки антибиотиков в данной работе был принят самокомплементарный фрагмент  $d(TCGA)_2$ , фланкируемый с концов CG-парами. Таким образом, формирование олигонуклеотидных дуплексов производилось по формуле  $(CG)_n(TCGA)(CG)_n$  при  $n=0,1,2,3$ . Формирование сайта интеркаляции (центральный CG-сайт) для каждого антибиотика производилось на 16-мере  $[(CG)_3(TCGA)(CG)_3]_2$  путем смещения половины всех его атомов вдоль оси спирали на 3.4 Å и их поворотом вокруг нее на угол  $\Delta\Omega$ , значения которого принимались равными величинам  $\Delta\Omega$  при интеркаляции соответствующих БАС в двойную спираль ДНК [23-25]. Молекулы NOG и NOV встраивались в CpG сайт ДНК со стороны большой канавки, а AMD и DAU – со стороны малой канавки. Структуры дуплексов ДНК меньшей длины получены из исходного 16-мера удалением концевых пар оснований. Аналогичным образом получены и комплексы антибиотиков с дуплексами ДНК от 4-мера до 14-мера (рис. 2).

Результаты расчета компонент электростатической энергии приведены в табл. 1. Изменение электростатической составляющей энергии Гиббса на этапах раскручивания ДНК, интеркаляции лиганда и полной энергии всего процесса комплексообразования приведены в табл. 2.

На рис. 3 приведены зависимости компонент  $\Delta G_c$  и  $\Delta G_k$  и полной электростатической энергии  $\Delta G_{эл}$  связывания лигандов от длины олигонуклеотида  $N$ . С увеличением числа пар оснований  $N$  значения сольватационной и кулоновской компонент энергии линейно возрастают по абсолютной величине (см. рис. 3). Однако, в целом, значения полной электростатической энергии  $\Delta G_{эл}$  не демонстрируют однозначной корреляции с  $N$ .

Важно отметить, что компоненты  $\Delta G_c$  и  $\Delta G_k$  для AMD и NOV (см. рис. 3 и табл. 2) изменяют знак по мере удлинения последовательности. При этом для олигомеров с  $N \geq 8$  (кроме AMD) знак составляющих  $\Delta G_c$  и  $\Delta G_k$  уже не зависит от  $N$ . В связи с этим, можно сделать вывод о том, что разделение суммарного электростатического вклада на компоненты для коротких последовательностей с  $N < 8$  может привести к некорректным суждениям о роли электростатики в стабилизации комплексов «антибиотик-ДНК». Интересно при этом отметить, что суммарная энергия  $\Delta G_{эл}$  сохраняет знак при любых  $N$ , что, тем не менее, не исключает возможности анализа суммарного электростатического вклада с использованием более коротких ( $N < 8$ ) олигонуклеотидных последовательностей.

Антибиотик AMD является единственным из исследованного ряда лигандов, для которого компонент  $\Delta G_c$  полной энергии меняет знак при  $N > 12$ . Это объясняется тем, что AMD занимает наибольшую из рассматриваемых лигандов площадь при посадке на ДНК из-за массивных лактонных колец молекулы, располагающихся в малой канавке. Таким образом, анализ электростатического вклада для протяженных молекул, таких, как лиганды, связывающиеся в канавку ДНК, или бис-интеркаляторы, рекомендуется проводить для олигонуклеотидов с  $N > 12$ .

Из табл. 1 следует, что абсолютное значение электростатической энергии взаимодействия свободных молекул антибиотиков с водным окружением  $G_c$  убывает в ряду:

$$NOG > DAU > AMD > NOV. \quad (6)$$

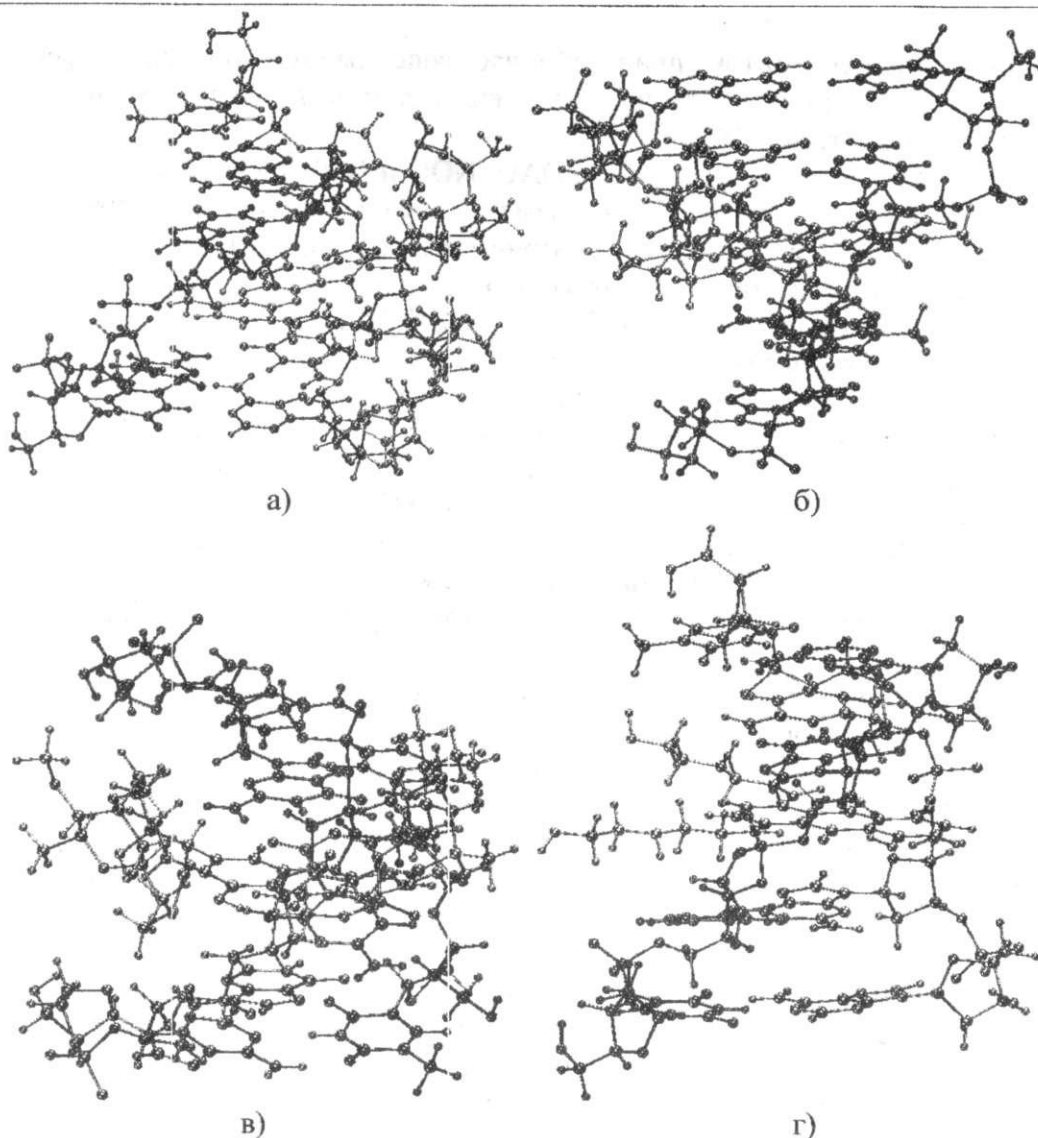


Рис. 2. Расчетные пространственные структуры комплексов дуплекса тетрамера  $d(\text{TCGA})_2$  с актиномицином D (а), дауномицином (б), ногаламицином (в) и новантроном (г)

Низкие значения  $G_c$  для AMD и NOV являются вполне ожидаемыми, поскольку эти лиганды нейтральны, в отличие от остальных. Следующие по мере возрастания  $G_c$  в (6) молекулы DAU и NOG содержат положительный заряд на боковых группах (см. рис. 1). Таким образом, величина электростатического взаимодействия ароматических антибиотиков с водным окружением  $G_c$  существенно зависит от наличия заряда на молекуле.

Электростатическое взаимодействие внутри молекул интеркаляторов  $G_k$  роли в стабилизации комплексов «антибиотик-ДНК» не играет и определяется характером распределения зарядов на атомных группах молекул.

Из табл. 2 следует, что изменение электростатической составляющей энергии взаимодействия с водным окружением  $\Delta G_c$  при раскручивании ДНК для всех антибиотиков и  $N > 8$  положительно. Это может быть объяснено тем, что при раскручивании ДНК увеличивается ее длина, следовательно, плотность заряда на поверхности уменьшается, что приводит к ослаблению взаимодействия с водным окружением [8]. Важно отметить, что  $\Delta G_c = 29.0$  ккал/моль, полученная в данной работе для сайта интеркаляции DAU в 10-мере (см. табл. 2) хорошо согласуется со значением  $\Delta G_c = 35.6$  ккал/моль, вычисленным в работе [8] для аналогичного олигонуклеотида.

## Электростатический вклад в энергию комплексообразования ...

Таблица 1. Расчетные значения электростатической составляющей энергии Гиббса (ккал/моль) для исходных и конечных компонентов реакции комплексообразования БАС с олигомерами ДНК различной длины

N	БАС			N-мер			N-мер раскрученный			N-мер+БАС		
	G <sub>н</sub>	G <sub>с</sub>	G <sub>к</sub>	G <sub>н</sub>	G <sub>с</sub>	G <sub>к</sub>	G <sub>н</sub>	G <sub>с</sub>	G <sub>к</sub>	G <sub>н</sub>	G <sub>с</sub>	G <sub>к</sub>
AMD				N-мер+AMD								
4	-0,1	-143	-57,2	-4,2	-3801	-1779	-4,2	-3797	-1769	-4,8	-3948	-1815
6				-11,4	-6151	-2682	-11,2	-6132	-2687	-12,0	-6297	-2719
8				-22,8	-8581	-3500	-22,1	-8544	-3531	-23,3	-8721	-3544
10				-37,6	-11068	-4259	-36,3	-11013	-4307	-38,0	-11198	-4312
12				-55,2	-13606	-4964	-53,6	-13543	-5019	-55,8	-13736	-5017
14				-74,4	-16179	-5632	-72,0	-16096	-5706	-74,7	-16296	-5696
16				-95,9	-18791	-6260	-93,3	-18696	-6344	-96,4	-18902	-6328
DAU				N-мер+DAU								
4	-0,1	-185	-48,3	То же	-4,2	-3802	-1775	-3,2	-3927	-1875		
6					-11,5	-6147	-2680	-9,5	-6240	-2815		
8					-22,6	-8565	-3508	-19,1	-8636	-3667		
10					-36,8	-11039	-4279	-32,5	-11093	-4455		
12					-53,5	-13563	-4997	-48,6	-13603	-5188		
14					-71,7	-16119	-5680	-66,1	-16148	-5884		
16					-92,3	-18719	-6319	-86,1	-18735	-6534		
NOG				N-мер+NOG								
4	-0,1	-224	-69,2	»	-4,3	-3797	-1776	-3,0	-3946	-1918		
6					-11,4	-6141	-2685	-9,1	-6264	-2854		
8					-22,7	-8562	-3513	-18,3	-8662	-3706		
10					-37,0	-11036	-4286	-31,5	-11117	-4501		
12					-53,9	-13561	-5005	-47,5	-13624	-5238		
14					-72,3	-16121	-5686	-65,2	-16169	-5935		
16					-93,0	-18720	-6327	-85,2	-18756	-6589		
NOV				N-мер+NOV								
4	0,0	-111	-48,6	»	-4,2	-3801	-1781	-4,4	-3906	-1823		
6					-11,5	-6145	-2691	-11,6	-6255	-2727		
8					-22,5	-8562	-3522	-22,6	-8676	-3554		
10					-36,5	-11033	-4299	-36,8	-11151	-4327		
12					-53,3	-13557	-5018	-53,8	-13679	-5042		
14					-71,6	-16115	-5702	-72,3	-16240	-5723		
16					-92,3	-18714	-6343	-93,1	-18841	-6362		

Вклад кулоновских взаимодействий в свободную энергию при раскручивании  $\Delta G_k$  для всех антибиотиков отрицателен (см. табл. 2), т.е. это взаимодействие способствует раскручиванию молекулы ДНК. Такая закономерность вызвана увеличением расстояния между отрицательно заряженными фосфатами при образовании интеркаляционной полости, что является энергетически выгодным процессом и согласуется с результатами расчета  $\Delta G_k$  для серии антрациклиновых производных в работе [8].

Обращает на себя внимание хорошая корреляция (фактор  $r$ ) при  $N \geq 8$  между значениями изменений угла раскручивания  $\Delta \Omega$  дуплекса ДНК при интеркаляции антибиотиков и расчетной энергии  $\Delta G_k$  внутримолекулярных кулоновских взаимодействий в двойной спирали при ее раскручивании (табл. 3): чем больше  $\Delta \Omega$ , тем глубже отрица-

тельные изменения энергии  $\Delta G_K$ . В принципе, это дает возможность производить оценку вклада  $\Delta G_K$  в энергетику сайта интеркаляции различных лигандов по известным  $\Delta Q$ . Отметим, что в работе [26] также была обнаружена корреляция электростатического потенциала в центре сайта интеркаляции со значением  $\Omega$ .

Таблица 2. Расчетные значения энергии Гиббса (ккал/моль) процессов раскручивания ДНК и интеркаляции антибиотика, а также полной электростатической энергии комплексообразования БАС с олигомерами ДНК различной длины

N	Раскручивание ДНК				Интеркаляция				Полная			
	$\Delta G_H$	$\Delta G_C$	$\Delta G_K$	$\Delta G_D$	$\Delta G_H$	$\Delta G_C$	$\Delta G_K$	$\Delta G_B$	$\Delta G_H$	$\Delta G_C$	$\Delta G_K$	$\Delta G_{эл}$
<i>N</i> -мер+AMD												
4	0,0	3,7	9,5	13,2	-0,5	-7,8	10,9	2,6	-0,5	-4,1	20,4	15,8
6	0,2	19,0	-4,8	14,4	-0,8	-21,8	24,6	2,0	-0,6	-2,8	19,7	16,4
8	0,7	37,1	-30,8	7,0	-1,2	-34,0	43,5	8,3	-0,5	3,0	12,7	15,3
10	1,3	55,2	-47,8	8,8	-1,7	-42,4	52,1	8,0	-0,3	12,9	4,3	16,8
12	1,6	63,1	-55,4	9,3	-2,2	-49,9	59,8	7,8	-0,6	13,2	4,4	17,1
14	2,3	82,7	-73,4	11,6	-2,6	-56,2	66,6	7,8	-0,3	26,6	-6,8	19,4
16	2,6	95,4	-84,1	14,0	-3,1	-62,5	73,3	7,7	-0,5	32,9	-10,7	21,7
<i>N</i> -мер+DAU												
4	0,0	-0,9	3,9	2,9	1,2	59,8	-51,7	9,3	1,1	59,0	-47,8	12,2
6	-0,1	3,7	1,8	5,5	2,1	92,6	-87,0	7,7	2,0	96,4	-85,2	13,2
8	0,2	15,2	-8,5	6,9	3,6	114	-110	7,7	3,8	130	-119	14,6
10	0,8	29,0	-20,0	9,8	4,4	131	-128	7,4	5,2	160	-148	17,2
12	1,7	43,3	-33,0	12,0	5,1	145	-142	7,3	6,8	188	-175	19,3
14	2,7	59,6	-47,9	14,4	5,7	157	-155	7,3	8,4	216	-203	21,8
16	3,6	72,8	-59,1	17,3	6,3	168	-167	7,3	9,9	241	-226	24,6
<i>N</i> -мер+NOG												
4	-0,1	3,6	2,9	6,4	1,4	74,6	-73,6	2,4	1,3	78,2	-70,7	8,8
6	0,0	10,3	-3,7	6,6	2,5	100	-99,6	3,0	2,4	110	-103	9,7
8	0,1	18,7	-13,0	5,8	4,5	124	-124	4,2	4,6	142	-137	10,0
10	0,6	32,2	-26,9	6,0	5,6	143	-145	3,5	6,2	175	-172	9,5
12	1,3	45,2	-40,8	5,8	6,6	160	-164	3,4	7,9	206	-204	9,2
14	2,1	58,3	-54,0	6,3	7,3	175	-179	3,4	9,4	234	-233	9,7
16	2,9	71,1	-67,2	6,7	8,0	188	-193	3,3	10,9	259	-260	10,1
<i>N</i> -мер+NOV												
4	0,0	0,0	-2,1	-2,1	-0,2	5,5	6,7	12,0	-0,2	5,5	4,6	9,9
6	0,0	6,5	-9,0	-2,5	-0,2	0,5	12,0	12,3	-0,2	6,9	3,0	9,7
8	0,3	19,1	-22,2	-2,8	-0,1	-4,3	16,7	12,3	0,2	14,9	-5,5	9,5
10	1,1	35,2	-39,2	-2,9	-0,3	-8,1	20,7	12,3	0,8	27,2	-18,5	9,5
12	1,9	48,7	-53,7	-3,1	-0,5	-11,5	24,2	12,3	1,4	37,3	-29,5	9,2
14	2,7	64,0	-69,4	-2,7	-0,7	-14,2	27,3	12,4	2,1	49,8	-42,1	9,7
16	3,6	77,6	-83,3	-2,0	-0,8	-16,9	30,0	12,3	2,9	60,7	-53,3	10,3

Вклад взаимодействий с ионным окружением  $\Delta G_H$  на этапах раскручивания ДНК (см. табл. 2), в целом положителен для всех рассмотренных лигандов, причем значения энергии  $\Delta G_H$  практически на порядок ниже по абсолютной величине в сравнении с  $\Delta G_C$  и  $\Delta G_K$ . Так же, как и для составляющей  $\Delta G_C$ , рассмотренной выше, положительный знак  $\Delta G_H > 0$  обусловлен удлинением ДНК при раскручивании, уменьшением плотности заряда и соответствующим уменьшением взаимодействия с ионным окружением.



## Электростатический вклад в энергию комплексообразования ...

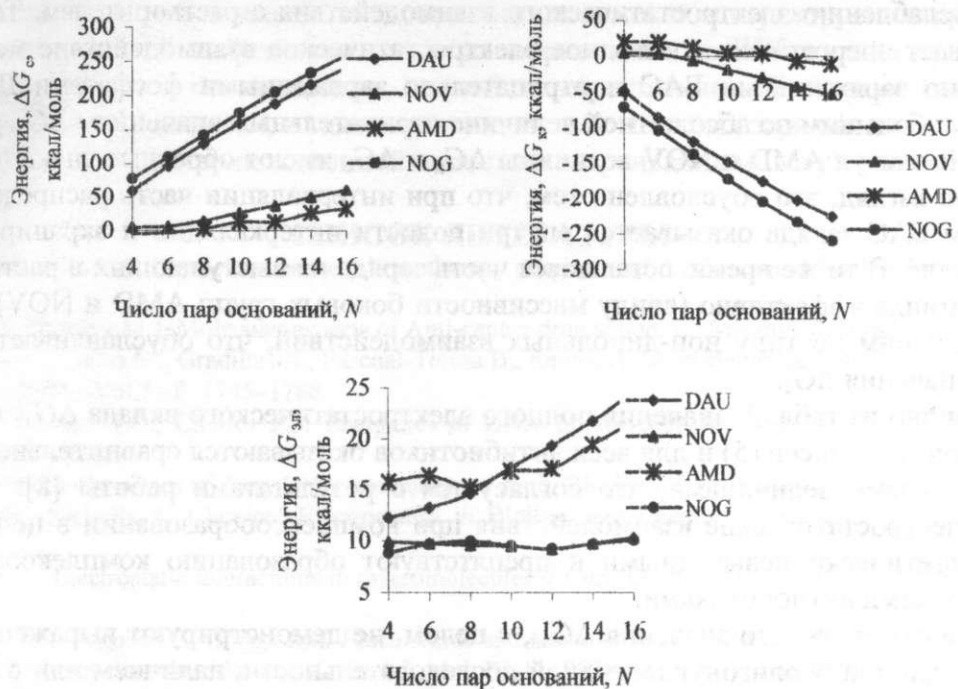


Рис. 3. Зависимость компонент электростатической энергии  $\Delta G_c$  и  $\Delta G_p$ , а также полной энергии  $\Delta G_{tot}$  от числа пар оснований  $N$  олигонуклеотида

Таблица 3. Корреляция ( $r$ ) между изменением угла спирального вращения  $\Delta\Omega$  и изменением энергии внутримолекулярных кулоновских взаимодействий  $\Delta G_k$  при образовании сайта интеркаляции

$N$	Лиганд	AMD	DAU	NOG	NOV	$r$
	$\Delta\Omega$ , град.	-26 [23]	-11 [23]	-18 [24]	-27 [25]	
4	$\Delta G_k$ , ккал/моль	9.52	3.86	2.89	-2.06	0.12
6		-4.82	1.80	-3.66	-8.95	0.78
8		-30.80	-8.51	-13.04	-22.23	0.77
10		-47.81	-20.01	-26.86	-39.23	0.80
12		-55.40	-33.01	-40.79	-53.69	0.89
14		-73.44	-47.90	-54.01	-69.42	0.88
16	-84.06	-59.05	-67.23	-83.28	0.92	

Из табл. 2 следует, что электростатические составляющие  $\Delta G_c$  и  $\Delta G_k$  полной энергии раскручивания  $\Delta G_p$  существенно зависят от структуры сайта интеркаляции, т.е. от типа лиганда. Как правило, в большинстве из известных работ по разделению энергетических вкладов в суммарную энергию комплексообразования ароматических БАС с ДНК [8,27] исследуются однотипные соединения, что позволяет пренебречь различием в энергии деформации сайта интеркаляции для различных лигандов.

Согласно расчетам (см. табл. 2), для DAU и NOG значения сольватационной составляющей  $\Delta G_c$  при интеркаляции лигандов положительны, а для NOV и AMD – отрицательны. В свою очередь, изменение энергии атом-атомного кулоновского взаимодействия  $\Delta G_k$ , наоборот, отрицательно для DAU и NOG и положительно для AMD и NOV. Такую закономерность можно объяснить тем, что молекулы первых двух антибиотиков несут единичный положительный заряд, а двух других – нейтральны. При интеркаляции положительно заряженных молекул в двойную спираль ДНК их заряды локально компенсируют отрицательный заряд ближайших фосфатов ДНК, что приводит к

общему ослаблению электростатического взаимодействия с растворителем. Также это обеспечивает энергетически выгодное электростатическое взаимодействие между положительно заряженными БАС и отрицательно заряженными фосфатами ДНК, что приводит к большим по абсолютной величине отрицательным значениям  $\Delta G_k$ . Для нейтральных молекул AMD и NOV величины  $\Delta G_k$  и  $\Delta G_c$  имеют обратные знаки (см. табл. 2). На наш взгляд, это обусловлено тем, что при интеркаляции часть распределенного по атомам БАС заряда оказывается внутри полости интеркаляции и экранировано от растворителя. В то же время, оставшаяся часть заряда на выступающих в растворитель атомах лиганда эффективно (ввиду массивности боковых групп AMD и NOV) взаимодействует с ним по типу ион-дипольных взаимодействий, что обуславливает отрицательные значения  $\Delta G_c$ .

Как видно из табл. 2, значения полного электростатического вклада  $\Delta G_{эл}$  являются суммой больших чисел (5) и для всех антибиотиков оказываются сравнительно малыми положительными величинами, что согласуется с результатами работы [8]. Следовательно, электростатические взаимодействия при комплексообразовании в целом являются энергетически невыгодными и препятствуют образованию комплексов ДНК с ароматическими антибиотиками.

Важно отметить, что значения  $\Delta G_{эл}$ , в целом, не демонстрируют выраженной корреляции с длиной  $N$  олигонуклеотидной последовательности, наличием или отсутствием заряда молекулы, а также со структурой антибиотика, поскольку определяются как сумма энергетических составляющих на этапах образования интеркаляционной полости и интеркаляции молекулы БАС. Поэтому можно сделать вывод о том, что установление корреляции структуры лиганда и энергии комплексообразования должно проводиться не на уровне суммарной электростатической энергии, а на уровне отдельных этапов процесса комплексообразования и отдельных компонент электростатической энергии.

## ВЫВОДЫ

В настоящей работе методом решения нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана впервые проведен расчет составляющих полной электростатической энергии комплексообразования с ДНК различных по структуре и физико-химическим свойствам ароматических антибиотиков в водной среде. Общая методология работы основана на разделении процесса интеркаляции на два этапа: образование уникальной для каждого лиганда интеркаляционной полости и встраивания в полость молекулы антибиотика, и последующим вычислении электростатической энергии на каждом из этих этапов как суммы двух составляющих: энергии взаимодействия с водной средой и энергии взаимодействия атомных зарядов БАС и ДНК. Сравнительный анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы:

- надежный анализ вклада различных компонент электростатической энергии комплексообразования ароматических антибиотиков с ДНК должен проводиться при длине олигонуклеотидной последовательности  $N \geq 8$ .

- электростатические взаимодействия, в целом, дестабилизируют комплексы «антибиотик-ДНК» в водной среде ( $\Delta G_{эл} > 0$ ), однако определяются суммой больших по величине и противоположных по знаку электростатических составляющих от взаимодействия комплекса с водным окружением и кулоновского взаимодействия атомных зарядов лиганда и ДНК. В связи с этим, корректный анализ электростатического вклада в энергетику комплексообразования ароматических антибиотиков с ДНК должен проводиться с одновременным учетом этих двух составляющих;

- согласно проведенному нами расчету, выраженная корреляция между структурой и зарядом антибиотика и суммарной электростатической энергией комплексообразова-

Электростатический вклад в энергию комплексообразования ...

ния отсутствует. Следовательно, интерпретация взаимосвязи структуры интеркалятора и электростатической энергии его комплексообразования с ДНК должна проводиться только путем анализа составляющих полной электростатической энергии (взаимодействие с водным окружением, а также взаимодействие атомных зарядов в комплексе) на этапах образования интеркаляционной полости и встраивания молекулы антибиотика.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chu E., DeVita V.T. Physicians' cancer chemotherapy drug manual. L.: Jones and Bartlett Publ.-2003.-512 p.
2. Neidle S., Waring M.J. Molecular aspects of Anti-cancer drug action. L.: Macmillan.-1983.-483 p.
3. Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., Pascual-Teresa B., Ramos A. Intercalators as Anticancer Drugs // *Curr. Pharm. Des.*-2001.-Vol.7.-P. 1745-1780.
4. Ren J., Jenkins T.C., Chaires J.B. Energetics of DNA Intercalation Reactions // *Biochemistry.*-2000.-Vol.39.-P. 8439-8447.
5. Haq I. Thermodynamics of drug-DNA interactions // *Arch. Biochem. Biophys.*-2002.-Vol.403.-P. 1-15.
6. Honig B., Nicholls A. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry // *Science* 1995.-Vol.268.-P. 1144-1149.
7. Sharp K.A. Electrostatic interactions in macromolecules // *Curr. Opin. Struct. Biol.* -1994.-Vol.4.-P. 234-239.
8. Baginski M., Fogolari F., Briggs J.M. Electrostatic and Non-electrostatic Contributions to the Binding Free Energies of Anthracycline Antibiotics to DNA // *J. Mol. Biol.*-1997.-Vol.274.-P. 253-267.
9. Chaires J.B. Dissecting the free energy of drug binding to DNA // *Anti-Cancer Drug Des.*-1996.-Vol.11.-P. 569-580.
10. Yang X.-L., Wang A.H.-J. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA // *Pharm. Ther.*-1999.-Vol.83.-P. 181-215.
11. Sharp K.A., Honig B. Calculating total electrostatic energies with the nonlinear Poisson-Boltzmann equation // *J. Chem. Phys.*-1990.-Vol.94.-P. 7684-7692.
12. Lee B., Richards F.M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility // *J. Mol. Biol.*-1971.-Vol.55.-P. 379-400.
13. Rocchia W., Alexov E., Honig B. Extending the applicability of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation: Multiple dielectric constants and multivalent ions // *J. Phys. Chem. B.*-2001.-Vol.105.-P. 6507-6514.
14. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The protein data bank // *Nucleic Acids Res.*-2000.-Vol.28.-P. 235-242.
15. Brunger A.T. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR-Yale: Univ. Press, 1992.-382 p.
16. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M.J., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules // *J. Am. Chem. Soc.* 1995.-Vol.117.-P. 5179-5197.
17. Cieplak P., Rao S.N., Grootenhuis P.D.J., Kollman P.A. Free energy calculations on base specificity of drug-DNA interactions: Application to daunomycin and acridine intercalation into DNA // *Biopolymers.*-1990.-Vol.29.-P. 717-727.
18. Allison S.A. End effects in electrostatic potentials of cylinders: models for DNA fragments // *J. Phys. Chem.*-1994.-V. 98.-P. 12091-12096.
19. Neidle S., Pearl L.H., Herzyk P., Berman H.M. A molecular model for proflavine-DNA intercalation // *Nucleic Acids Res.*-1988.-Vol.16.-P. 8999-9016.
20. Kotovych G., Lown J.W., Tong J.P. High-field <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR studies on the binding of the anticancer agent mitoxantrone to d(CpGpApTpCpG)<sub>2</sub> // *J. Biomol. Struct. Dyn.*-1986.-Vol.4.-P. 111-125.
21. 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.-Vol.29.-P. 2538-2549.
22. Snyder J.G., Hartman N.G., D'Estantoit B.L., Kennard O., Remeta D.P., Breslauer K.J. Binding of actinomycin D to DNA: Evidence for a nonclassical high-affinity binding mode that does not require GpC sites // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1989.-Vol.86.-P. 3968-3972.
23. Feigon J., Denny W.A., Leupin W., Kearns D.R. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: <sup>1</sup>H NMR study of binding mode and kinetics // *J. Med. Chem.*-1984.-Vol.27.-P. 450-465.
24. 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.-Vol.54.-P. 247-279.
25. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z., Traganos F., Melamed M.R. Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids // *Biochem. Pharm.*-1981.-Vol.30.-P. 231-240.

26. Medhi C., Mitchell J.B.O., Price S.L., Tabor A.B. Electrostatic Factors in DNA Intercalation // *Biopolymers*.—1999.—Vol.52.—P. 84–93.
27. Rudnicki W.R., Kurzepa M., Szczepanik T., Priebe W., Lesyng B. A simple model for predicting the free energy of binding between anthracycline antibiotics and DNA // *Acta Biochim. Polon.*—2000.—Vol.47.—P. 1–9.