

УДК 577.32

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПРОИЗВОДНОЙ АКТИНОЦИНА И ДВУСПИРАЛЬНОЙ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

А.В. Шестопалова, Е.В. Мирошниченко

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я.Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры 12, 61085, Харьков
e-mail: shestop@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 8 июня 2005 г.

На основании анализа результатов молекулярного докинга и известных экспериментальных данных по изучению комплексообразования производной актиноцина (ActIII) и двуспиральной полирибоцитидиловой кислоты (polyrC) получены пять наиболее вероятных комплексов ActIII - polyrC, в которых рассчитанные энергии взаимодействия мишень-лиганд минимальны и комплексы стабилизируются межмолекулярными водородными связями между донорно-акцепторными группами ActIII и polyrC. В образовании водородных связей со стороны polyrC участвуют группы цитозина и/или атомы кислорода сахарофосфатного остова, а со стороны ActIII - NH₂, C=O, NH-группы феноксазонового хромофора и боковых аминоалкильных радикалов. С помощью метода Монте Карло определено влияние растворителя – молекул воды на структуру комплексов, полученных молекулярным докингом. Моделирование выполнено с учетом 800 молекул воды. Показано, что молекулы воды могут дополнительно стабилизировать комплексы полинуклеотидной мишени и лиганда, занимая мостиковые положения между их донорно-акцепторными группами. На основе анализа результатов моделирования и эксперимента один из комплексов ActIII – polyrC выбран как наиболее вероятный.

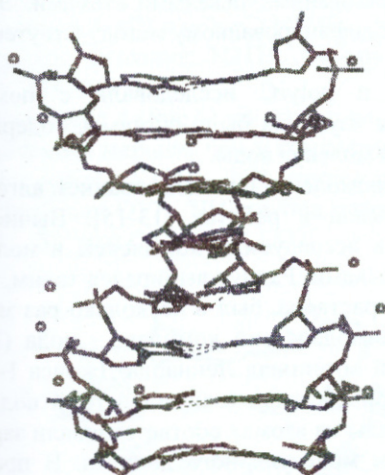
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярный докинг, метод Монте Карло, двуспиральная полирибоцитидиловая кислота, производная актиноцина.

Исследования молекулярных механизмов взаимодействий мишень-лиганд необходимы для понимания фармакологической активности многих лекарственных препаратов. Эффективность действия лекарства на молекулярном уровне, или специфичность его взаимодействия с мишенью – молекулой биополимера, оценивается по геометрической комплементарности их взаимодействующих частей и по наличию сил взаимодействия (электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных), позволяющих определить энергетическую предпочтительность моделируемых систем. Мишенями для многих ароматических биологически активных веществ, к которым относятся противоопухолевые антибиотики, являются молекулы ДНК и РНК. Удобными моделями ДНК при изучении взаимодействия ДНК-антибиотик могут быть двуспиральные полинуклеотиды, в частности, двуспиральная полупротонированная полирибоцитидиловая кислота polyrC.

Выполненные в нашей лаборатории экспериментальные исследования комплексообразования двуспиральной polyrC с производной актиноцина ActIII показали, что феноксазоновое кольцо лиганда не встраивается между плоскостями соседних пар оснований этого полинуклеотида [1,2]. Комплекс двуспиральной polyrC с ActIII, возможно, образуется по типу внешнего связывания и стабилизируется несколькими межмолекулярными ВС. На основе анализа экспериментальных результатов были сделаны предположения о том, какие атомные группы мишени (polyrC) и лиганда (ActIII) участвуют в образовании таких ВС. Методы компьютерного моделирования могут дополнить возможности экспериментальных исследований и предложить наиболее вероятные молекулярные модели комплексов. Целью выполненных исследований было получение таких моделей для комплексов двуспиральной полирибоцитидиловой кислоты polyrC с аналогом противоопухолевого антибиотика актиномицина D - производной актиноцина ActIII методами молекулярного докинга и Монте Карло.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно литературным данным [3-5] полирибоцитидиловая кислота polyrC при pH 4.5 образует двойную спираль с параллельными цепями и наполовину протонированными парами CH⁺ - C. Нами была построена модель двуспиральной polyrC с использованием следующих рентгенструктурных данных [6]: расстояние между двумя соседними нуклеотидами вдоль оси спирали h = 3.11 Å, угол спирального вращения τ = 30°. Заряды на атомах пары CH⁺ - C были рассчитаны с помощью полуэмпирического метода квантовой химии pm3 в программе HyperChem Professional 7.



Структуру двойной спирали polyrC оптимизировали сначала в вакууме в рамках силового поля AMBER 96 [7] до значения градиента, не превышающего 1 ккал/(моль·Å). После этого добавляли противоионы (K^+) и помещали фрагмент polyrC (8 пар $CH^+ - C$) в ячейку, содержащую до 1140 молекул воды (модель TIP3P [8]). Далее проводилась оптимизация растворителя с последующей оптимизацией всей системы до значения градиента, не превышающего 1 ккал/(моль·Å). При оптимизации использовали метод наискорейшего спуска. На рис.1 приведена оптимизированная структура двуспиральной polyrC.

Рис.1 Оптимизированная структура двуспиральной polyrC.

Координаты и заряды на атомах производной актиноцина ActIII (заряд +2) рассчитывали с помощью полумпирического метода квантовой химии pm3 в программе HyperChem Professional 7. После этого, как и в случае с polyrC, проводили оптимизацию геометрии ActIII в вакууме и в воде до значения градиента, не превышающего 0.1 ккал/(моль·Å). Оптимизированная структура производной актиноцина ActIII приведена на рис.2б.

В полученных структурах водородные связи (ВС) определяли по геометрическому критерию: расстояние между атомом водорода и акцептором ВС не более 2,7Å, угол между акцептором ВС, атомом водорода и донором ВС больше 120°.

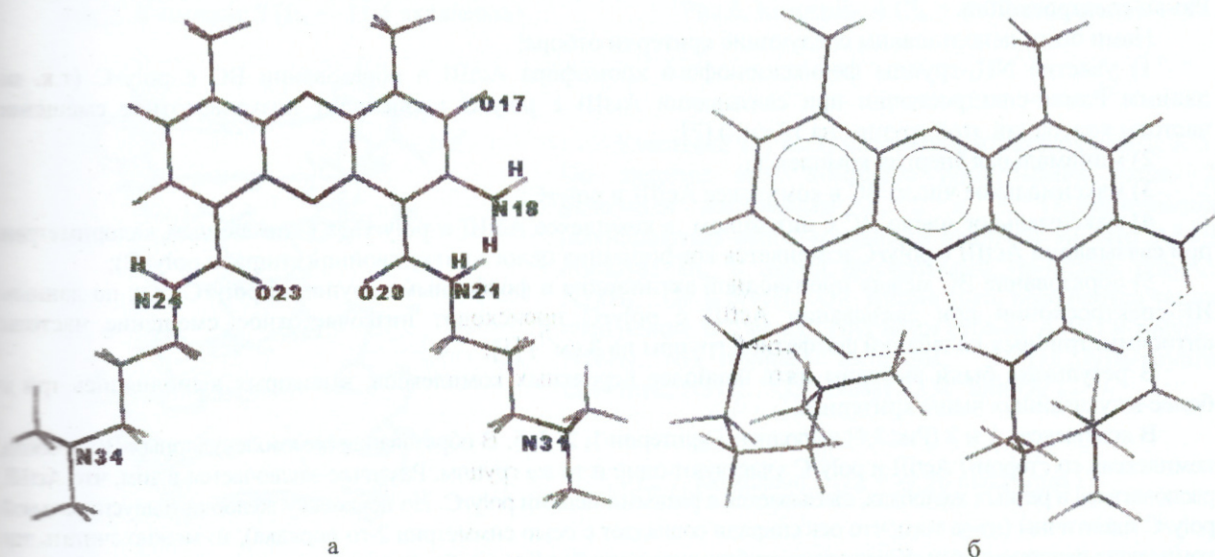


Рис.2. Структура производной актиноцина ActIII. Показаны атомы, которые участвуют в образовании межмолекулярных ВС с polyrC.

Оптимизированная структура производной актиноцина ActIII. Внутримолекулярные ВС показаны пунктиром.

Методом молекулярного докинга с помощью программного пакета AutoDock 3.05 [9] были получены возможные комплексы двуспиральной полирибозитидиловой кислоты polyrC и производной актиноцина ActIII. При моделировании использовался генетический алгоритм Ламарка с такими параметрами: размер популяции – 100 особей, максимальное число оценок энергии 10 000 000, максимальное число поколений 27000. Энергию взаимодействия polyrC и ActIII в комплексе (E_b) рассчитывали как сумму энергий ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических взаимодействий, энергии торсионного вращения и энергии дегидратации лиганда. Энергию ван-дер-ваальсовых взаимодействий вычисляли с помощью потенциала Леннарда-Джонса, а энергию водородных связей – с помощью потенциала 10-12. При расчете электростатических взаимодействий использовали зависящую от расстояния диэлектрическую функцию Мелера и Сольмайера для моделирования экранирования растворителя [10]. Проигрыш в энтропии из-за потери торсионных степеней свободы лигандом при его связывании с мишенью учитывали с помощью энергии торсионного вращения. Это слагаемое было

пропорционально числу свободных торсионных углов лиганда, образованных тяжелыми атомами. Энергия дегидратации вычислялась только для атомов углерода лиганда по модифицированному методу Стоутена [11]. Конформация мишени – polyrC – не изменялась.

Влияние растворителя на комплексообразование ActIII и polyrC исследовали с помощью компьютерного моделирования методом Монте Карло. Объектом изучения были системы, содержащие полученные в результате молекулярного докинга комплексы и 800 молекул воды.

Применение метода Монте Карло для изучения гидратации биомолекул с использованием алгоритма Метрополиса [12] и процедура моделирования подробно описана в работах [13-15]. Вычисления проводились в NVT ансамбле при температуре 298К. В расчетах исследуемые комплексы и молекулы воды помещались в центр сферы с жесткими отражательными стенками. Радиус выбирался таким, чтобы объем сферы, необходимый для создания нормальной плотности раствора, был в несколько раз меньше используемого. Для вычисления энергии межмолекулярных взаимодействий комплекс - вода (E_{wrc} и E_{wact}) и polyrC - ActIII (E_{act-rC}) использовался модифицированный потенциал Леннарда-Джонса 1-6-12 с параметрами, полученными Полтевым и соавторами [16,17]. При расчетах взаимодействий вода-вода (E_{ww}) использован полуэмпирический потенциал 1-6-exp [18]. Заряды на атомах соответствовали зарядам, полученным для комплексов при выполнении расчетов методом молекулярного докинга. В процессе моделирования молекула ActIII смещалась относительно polyrC согласно алгоритму Метрополиса. Конформация polyrC при моделировании не изменялась.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результатом моделирования методом молекулярного докинга является набор структур комплексов, которые оцениваются по энергетическим и стерическим параметрам, определяющим максимальное соответствие места посадки на молекуле – мишени и структуры лиганда.

При выборе наиболее вероятных структур комплексов учитывались данные, полученные при исследовании комплексообразования ActIII с двуспиральной polyrC методами спектрофотометрии и Раман спектроскопии.

Нами были использованы следующие критерии отбора:

- 1) участие NH_2 -группы феноксазонофого хромофора ActIII в образовании ВС с polyrC (т.к. по данным Раман-спектроскопии при связывании ActIII с polyrC происходит низкочастотное смещение частоты колебаний этой группы на 18 см^{-1}) [2];
- 2) минимальная энергия комплекса;
- 3) максимальное число ВС в комплексе ActIII и polyrC;
- 4) максимальное число ВС с цитозином в комплексе ActIII и polyrC (т.к. по данным калориметрии при связывании ActIII с polyrC изменяется конформация целого витка двойной спирали polyrC);
- 5) образование ВС между производной актиноцина и фосфатными группами polyrC (т.к. по данным ИК-спектроскопии при связывании ActIII с polyrC происходит низкочастотное смещение частоты антисимметричных колебаний фосфатной группы на 8 см^{-1}) [1];

В результате были выбраны пять наиболее вероятных комплексов, в которых выполнялись три и более из указанных выше критериев.

В комплексах 1 и 2 (Рис.3,4) выполнены критерии 1, 2, 3, 5. В образовании межмолекулярных ВС в обоих комплексах со стороны ActIII и polyrC участвуют одни и те же группы. Различие заключается в том, что ActIII, располагаясь в разных желобках, связывается с разными цепями polyrC. Но поскольку желобки в двуспиральной polyrC идентичны (из-за того, что ось спирали совпадает с осью симметрии 2-го порядка), то можно считать эти комплексы равноценными. Комплексы стабилизируются благодаря образованию шести следующих ВС между атомами ActIII и polyrC: $N18H_2...O$ фосфатной группы; $N18H_2...NH_2$ -группа цитозина; $N21H...O2'$ рибозы; $N31H...CO$ -группа цитозина; $N24H...O3'$; $N34H...O3'$ или $O2'$ рибозы.

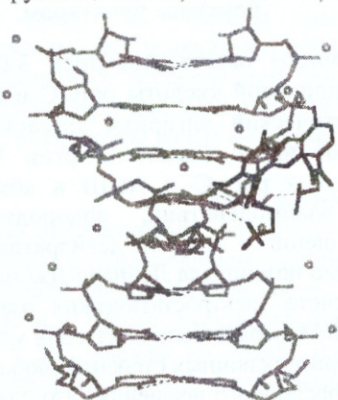


Рис.3. Комплекс 1 ($E_b = -11.2$ ккал/моль)

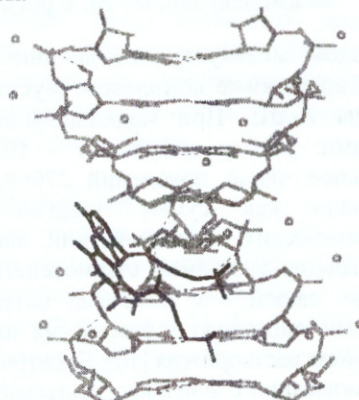


Рис.4. Комплекс 2 ($E_b = -11.0$ ккал/моль)

Комплекс 3 (Рис.5) удовлетворяет критериям 1, 2, 3, 4. В этом комплексе ВС образуют следующие пары атомов ActIII и polyrC: N18H₂...NH₂-группа цитозина1; N18H₂...NH₂-группа цитозина или C=O17...NH₂-группа цитозина; N21H...CO-группа цитозина; N31H...CO-группа цитозина; N24H...O2' рибозы; N34H...O3' или O2'.

Комплекс 4 (Рис.6) по структуре близок к комплексу 3, но его энергия по абсолютной величине на 1.7 ккал/моль меньше, чем у комплекса 3 (выполнены критерии 1, 3, 4). В образовании ВС участвуют от ActIII и polyrC: N18H₂...NH₂-группа цитозина1 или N18H₂...CO-группа цитозина1; N18H₂...NH₂-группа цитозина2 или O17...NH₂-группа цитозина2; N21H...CO-группа цитозина; N31H...NH₂-группа цитозина; N24H...O3' или O2'; N34H...O2'.

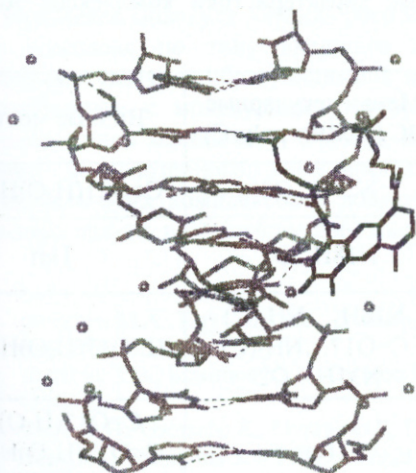


Рис.5. Комплекс 3 ($E_b = -11.4$ ккал/моль)

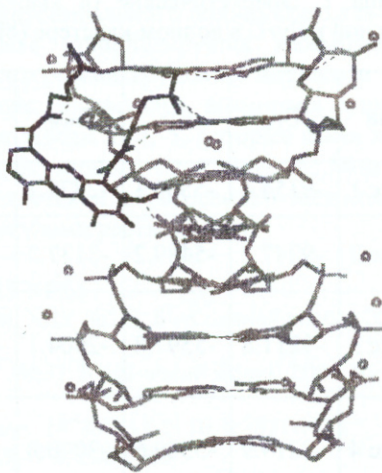
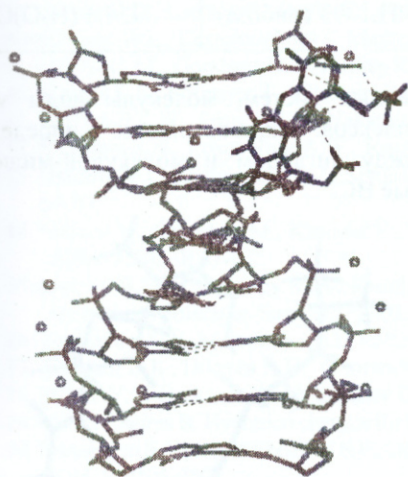


Рис.6. Комплекс 4 ($E_b = -9.72$ ккал/моль)



Комплекс 5 (Рис.7) удовлетворяет критериям 1, 3, 5. По энергии этот комплекс проигрывает около 2 ккал/моль комплексам 1, 2 и 3. Отличительной особенностью этого комплекса является то, что ActIII образует ВС с двумя фосфатными группами polyrC: N18H₂...OP и N34H...OP. Кроме того, образуются также следующие ВС между группами атомов ActIII и polyrC: N18H₂...NH₂-группа цитозина; N21H...NH₂-группа цитозина; N31H...O2'; N24H...O4' или O2'.

Рис.7. Комплекс 5 ($E_b = -9.26$ ккал/моль)

Известно, что существенную роль в формировании пространственной структуры нуклеиновых кислот играет водное окружение. В частности, при исследовании факторов, определяющих стабильность двойной спирали полупротонированной полирибозитидиловой кислоты было показано, что наряду со стэкингом оснований и стерическими ограничениями, которые налагает стандартная геометрия нуклеотидов на геометрию сахарофосфатного остова, в стабилизации двойной спирали участвуют водные мостики и цепочки молекул воды, являющиеся как бы элементами структуры спирали. Поэтому можно утверждать, что стабильность двойной спирали polyrC определяется формированием специфической структуры молекул воды вблизи полинуклеотида [14]. Определенную роль водное окружение может оказывать и на стабильность комплексов нуклеиновых кислот и малых молекул [15,19,20].

С помощью моделирования методом Монте Карло систем, содержащих комплексы ActIII-polyrC и водные кластеры, мы оценили изменения в структуре комплексов, полученных методом молекулярного докинга, которые вызваны взаимодействием с растворителем - водой.

Результаты моделирования представлены в таблице 1. В ней приведены полные потенциальные энергии систем (E_{Tot}), представляющие собой сумму энергий взаимодействия молекул воды (E_{ww}), энергий взаимодействия молекул воды с polyrC (E_{wrc}) и ActIII (E_{wAct}), энергий взаимодействия в комплексе ActIII-polyrC (E_{Act-rC}).

Как видно из полученных данных, полные энергии систем для всех рассмотренных комплексов отличаются незначительно - не более чем на 1%. По значениям энергий межмолекулярных взаимодействий ActIII и polyrC - $E_{\text{Act-rC}}$ - наиболее выгодными являются комплексы 1 и 3: $E_{\text{rC-Act}} = -517.5$ ккал/моль и $E_{\text{rC-Act}} = -476.9$ ккал/моль, соответственно. Анализ мгновенных конфигураций позволяет рассмотреть более детально изменение структуры этих комплексов в водном кластере по сравнению с результатами молекулярного докинга, в котором влияние растворителя учитывается неявно. В комплексе 1 сохранилась только одна межмолекулярная ВС, а в комплексе 3 возможно образование трех межмолекулярных ВС.

Таблица 1. Энергетические (в ккал/моль) и структурные характеристики комплексов ActIII и дуспиральной polyrC в водном кластере (800 молекул воды).

Система	E_{Tot}	E_{ww}	E_{wrc}	E_{wAct}	$E_{\text{Act-rC}}$	Межмолекулярные ВС (ActIII - polyrC)	Водные мостики
Комплекс 1	-9154.4	-5550.1	-2877.1	-210.7	-516.5	N21H...O2'	C=O21(H ₂ O)H ₂ N(C)
Комплекс 2	-9247.2	-5489.2	-3137.3	-252.5	-368.2	N18H...O2'	Нет
Комплекс 3	-9211.8	-5597.8	-2904.1	-229.3	-479.9	N18H ₂ ...NH ₂ (C) C=O17...NH ₂ (C) N31H...O2'	C=O17(H ₂ O)H ₂ N(C)
Комплекс 4	-9219.9	-5509.6	-3000.8	-228.9	-439.2	Нет	C=O17(H ₂ O)O2' C=O17(H ₂ O)H ₂ N(C) N31H (H ₂ O)C=O (C)
Комплекс 5	-9258.2	-5514.1	-3051.2	-226.9	-465.9	N24H...O3'(рибоза)	N34H (H ₂ O)OP

Как показывает анализ мгновенных конфигураций изученных систем, молекулы воды могут стабилизировать структуры четырех из пяти рассмотренных комплексов. Так, в комплексе 4 определены три молекулы воды, занимающие мостиковое положение между лигандом и молекулой-мишенью (таблица 1). Но в этом комплексе разорвались все межмолекулярные ВС.

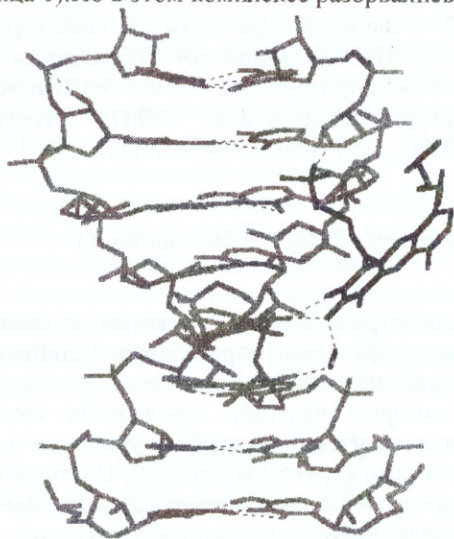


Рис.8. Структура комплекса 3 после моделирования в водном кластере методом Монте Карло. ВС показаны пунктиром.

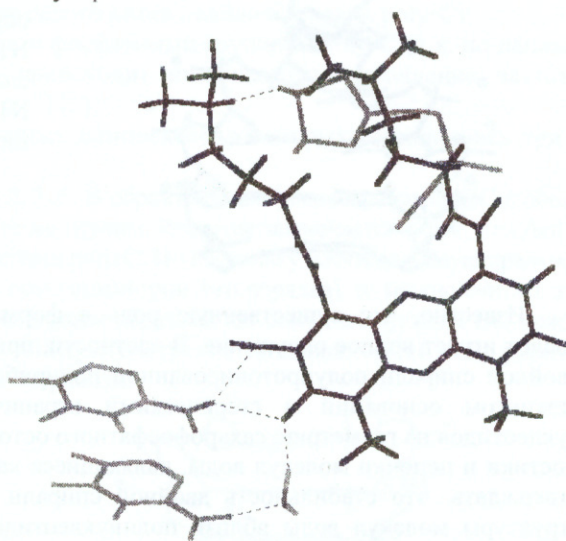


Рис.9. Водородные связи в месте связывания ActIII (комплекс 3) после моделирования в водном кластере методом Монте Карло.

Для комплексов 1, 3 и 5 также найдены молекулы воды, расположенные между донорно-акцепторными группами ActIII и двойной спирали polyrC и образующие с ними ВС. То есть наряду с межмолекулярными ВС эти комплексы дополнительно стабилизируются водным окружением.

При моделировании структур комплексов в водных кластерах только в комплексе 3 выполняются четыре критерия, предъявляемых к наиболее вероятной молекулярной модели, а именно: участие NH_2 -группы феноксазонового хромофора ActIII в образовании ВС с polyrC; близкая к минимальной энергия взаимодействия ActIII и polyrC; максимальное число ВС в комплексе ActIII и polyrC; максимальное число ВС с цитозином в комплексе ActIII и polyrC.

Поэтому используя все полученные при моделировании и экспериментальных исследованиях данные, мы можем предложить структуру, соответствующую комплексу 3 (Рис.8, 9), как наиболее вероятную молекулярную модель комплекса ActIII и двуспиральной polyrC. Именно в этом комплексе выполняется большинство критериев, которые необходимы для образования стабильного комплекса. В таком комплексе молекула лиганда располагается в желобке двуспирального полинуклеотида и образует с ним комплекс по типу внешнего связывания. Комплекс стабилизируется межмолекулярными водородными связями, образующимися между донорно-акцепторными группами мишени и лиганда, и взаимодействием с молекулами растворителя. Тем не менее, в растворе возможно существование нескольких типов комплексов, близких по структурам к комплексам 1, 3, 5, которые были получены с помощью компьютерного моделирования методами молекулярного докинга и Монте Карло. Устойчивость этих комплексов в водных растворах определяется и образованием межмолекулярных водородных связей, и специфическим взаимодействием с молекулами растворителя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов М.А., Круглова Е.Б., Дюпельников Е.В. и др. // Вісн. ХДУ №528. Біофізичний вісник. 2001. Вип.2(9). С.33-39.
2. Болбух Т.В., Близнюк Ю.Н., Круглова Е.Б. и др. // Вісн. ХНУ №637. Біофізичний вісник. 2004. Вип.1(14). С.38-42.
3. Prescott B., Gamache R., Livramento J., Thomas G.J. // Biopolymers. 1974. V.13, N 10. P.1821-1845.
4. Yang J.T., Samejima T. // Prog.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. 1976. V.9. N 2. P.223-300.
5. Leslie A.G.W., Arnott S. // J.Mol.Biol. 1978. V.119. P.399-414.
6. Langridge R.A., Rich A. // Nature.1963. V.198. N 4882. P.725-728.
7. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1995. V.117. P.5179-5192.
8. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. // J. Chem. Phys. 1983. V.79. P.926-935.
9. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S. et al. // J.Comput. Chem. 1998. V.19. P. 1639-1651.
10. Mehler E.L., Solmajer T. // Protein Engineering. 1991. V.4. P.903-910.
11. Stouten P.F.W., Frommel C., Nakamura H. et. al. // Mol. Simulation. 1993. V.10. P.97-120
12. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.N., Teller E. // J.Chem.Phys. 1953. V.21. P.1087-1092.
13. Danilov V.I., Zheltovsky N.V., Slyusarchuk O.N., Poltev V.I., Alderfer J.L. // J.Biomol.Struct. Dyn. 1997. V.15. P. 69-80.
14. Maleev V., Semenov M., Kashpur V., Bolbukh T., Shestopalova A., Anishchenko D. // Journal of Mol. Structure. 2002. V.605. P.51-61.
15. Maleev V.Ya., Semenov M.A., Kруглова Е.Б., Болбух Т.В., Гасан А.И., Бereznyak E.G., Shestopalova A.V. // Journal of Molecular Structure. 2003. V.645. P.145-158.
16. Teplukhin A.V., Malenkov G.G., Poltev V.I. // J.Biomol.Struct.Dyn. 1998. V.16. N 2. P.289-300.
17. Журкин В.Б., Полгев В.И., Флорентьев В.Л. // Мол.биол. 1980. Т.14. Вып.5. С.1116-1130.
18. Poltev V.I., Groklina T.I., Malenkov G.G. // J.Biomol.Struct.Dyn. 1984. V.2. N 3. P.413-429.
19. Qu X., Chaires B. Hydration changes for DNA intercalation reactions. // J.Amer.Chem.Soc. 2001. V.123. P.1-7.
20. Breusegem S.Y., Sadat-Ebrahimi S.E., Douglas K.T., Bichenkova E.V., Clegg R.M., Loontjens F.G. // J.Med.Chem. 2001. V.44. P. 2503-2506.