

УДК 577.32

**ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
КОФЕИНА И ПРОИЗВОДНЫХ АКТИНОЦИНА С ДНК МЕТОДОМ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.
I. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МОНОМЕРНЫХ И ДИМЕРНЫХ ФОРМ
ПРОИЗВОДНОГО АКТИНОЦИНА В ИОН-ГИДРАТНОМ ОКРУЖЕНИИ.**

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

**Харьковский национальный университет, пл.Свободы, 4, 61077, Харьков;
Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 61085, Харьков
e-mail: anyden@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 5 июля 2002 г.

Методом молекулярной динамики изучены процессы взаимодействия одного из производных актиноцина в мономерной и димерной форме с ион-гидратным окружением. Учтено влияние присутствующих в растворе ионов на общий заряд молекулы и характер гидратации лиганда. Для всех рассмотренных систем определены схемы гидратации, хорошо согласующиеся с экспериментальными данными. Получены структуры наиболее вероятных форм димеров и проведен анализ сил, стабилизирующих такие комплексы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: производные актиноцина, димеризация, гидратация, метод молекулярной динамики, ab initio.

Знание механизмов действия лекарственных препаратов на молекулярном уровне может быть полезным как для направленного синтеза новых биологически активных веществ (БАВ), так и для понимания фармакологического действия уже известных соединений.

При описании взаимодействия БАВ с ДНК необходимо учитывать возможность образования комплексов различных лигандов между собой и друг с другом, а также их конкуренцию за места посадки на молекуле ДНК. Эти процессы влияют на число связываемых с ДНК молекул БАВ и тем самым изменяют фармакологическую активность этих веществ. Взаимодействие происходит в ион-гидратном окружении, что требует включить в рассмотрение молекулы воды и присутствующие в растворе ионы. Изменение структуры воды и схемы гидратации растворенных молекул при образовании ассоциатов играют заметную роль в стабилизации таких структур [1]. Результаты экспериментальных исследований [2, обзор 3] указывают на необходимость учета первичной гидратной оболочки при изучении взаимодействия различных лигандов с фрагментами ДНК. Использование методов молекулярного моделирования позволяет оценить роль различных факторов и получить детальную информацию о структуре взаимодействующих молекул и об их гидратном окружении.

В статье мы рассматриваем одно из новосинтезированных соединений актиноцина (ActII, рис. 1), аналогов актиномина Д. Фармакологическое действие этого антибиотика определяется его специфическим связыванием с ДНК [4-7]. Изучение производных актиномина Д, образующих различные типы комплексов с молекулой ДНК, может прояснить механизмы молекулярного узнавания малыми лигандами специфических участков последовательности ДНК и быть полезным при синтезе новых БАВ.

Целью работы было молекулярно-динамическое изучение мономерных и димерных форм ActII с учетом влияния присутствующих в растворе ионов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярная динамика - это метод компьютерного моделирования, в котором временная эволюция набора взаимодействующих атомов получается путем интегрирования ньютоновских уравнений их движения. Этот метод широко используется для исследования структуры, динамики и термодинамики нуклеиновых кислот и других биомолекул [см. обзоры 8, 9].

Моделирование проведено с использованием силового поля AMBER 96 [10] в NVT ансамбле с временным шагом $1 \cdot 10^{-15}$ с. Обработка нековалентных взаимодействий проходила с помощью «переключающей» функции, гладко сдвигающей энергию этих взаимодействий к нулю с расстоянием отсечки 10-12 Å. При расчетах площади поверхности молекулы лиганда, доступной для растворителя, использовался

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия кофеина ...

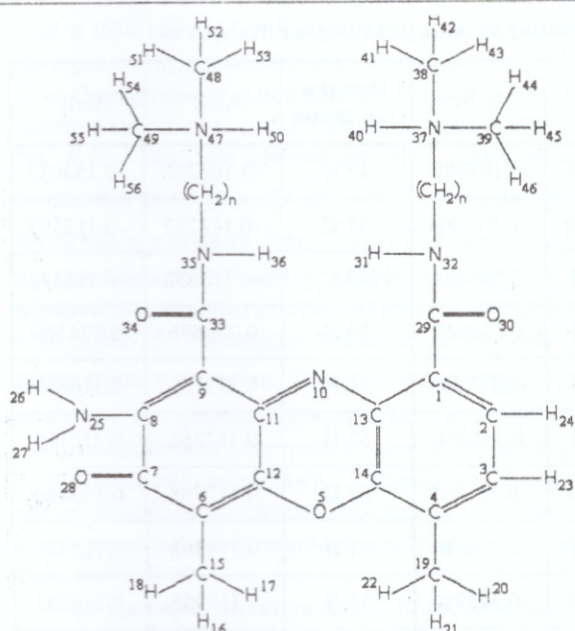


Рис. 1. Структурная формула и использованные обозначения для ActII ($n=2$).

с зарядом +1, моделирование проводилось как в чистой воде, так и в присутствии ионов Na^+ и Cl^- , в количестве, соответствующем концентрации раствора около 0.15 M NaCl. После этого, при фиксированной геометрии растворенного лиганда, в ячейке была оптимизирована структура молекул воды. Затем оптимизировалась вся система.

Первым шагом моделирования был разогрев системы от 0 до 298 K в течение $10 \cdot 10^{-12}$ с. После этого шло уравнивание системы при фиксированной температуре, что занимало не более $70 \cdot 10^{-12}$ с. Общее время моделирования $320 \cdot 10^{-12}$ с. На протяжении последних $10 \cdot 10^{-12}$ с система охлаждалась до 10 K с для получения F-структуры. Это вызвано тем, что водородная связь (ВС) не может быть строго определена для мгновенных структур (I-структур) [15]. Поэтому для анализа моделируемых систем путем понижения температуры мы получаем "замороженную" F-структуру, которая представляет собой конфигурацию системы, соответствующую ближайшему к данной мгновенной структуре локальному минимуму потенциальной энергии. В F-структурах проявляются основные черты строения этих систем, а ВС определяются в них практически однозначно. Мы определяли ВС по геометрическому критерию: расстояние между атомами донора и акцептора ВС не более 3.2 Å, расстояние между атомом водорода и акцептором ВС не более 2.1 Å [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Мономеры лиганда ActII. Было изучено два мономера ActII: с общим зарядом +1 (ActII^+) и с зарядом +2 (ActII^{2+}). Заряд +1 возникает при включении не ковалентно связанного иона Cl^- в качестве структурного элемента молекулы лиганда. Стартовые конформации этих молекул в вакууме показаны на рис. 2 (а, б) и рис. 3 (а, б). При этом в молекуле ActII^{2+} существует внутримолекулярная ВС между группами O34 и HN47, а в молекуле ActII^+ более вероятно образование ВС между группами O30 и HN35. Система ActII^{2+} в присутствии ионов в растворе не рассматривалась, т. к. существование лиганда с зарядом +2 в таких условиях маловероятно.

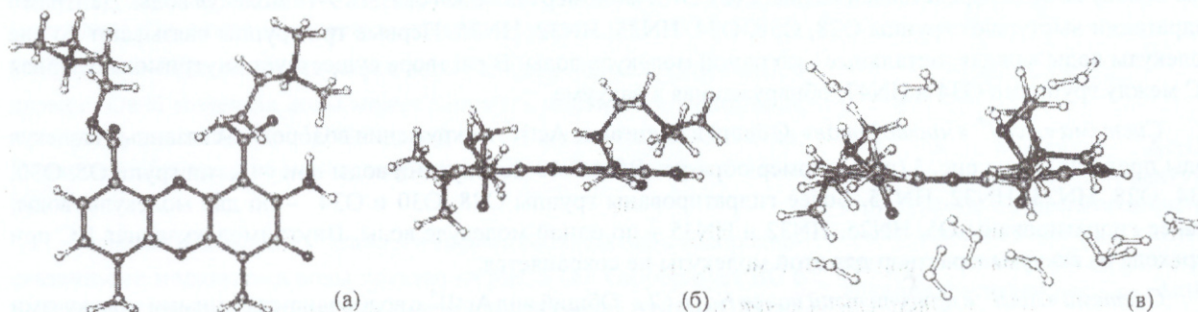


Рис. 2. Молекула ActII^{2+} : (а, б) оптимизированная в вакууме структура, (в) фрагмент системы « ActII^{2+} в чистой воде» и водородно-связанные с ActII^{2+} молекулы воды.

подход Gasteiger и Marsili [11].

В сухом состоянии изучаемый лиганд находится в виде соли $\text{ActII}(\text{Cl})_2$. При растворении происходит двухступенчатая диссоциация с поэтапным отделением ионов Cl^- . Поэтому в растворе присутствуют катионы ActII с общим зарядом +1 (сохраняют один из ионов Cl^-) и +2 (потерявшие все ионы Cl^-). Нами изучены мономеры лиганда ActII (Рис. 1) с общим зарядом +1 (ActII^+) и +2 (ActII^{2+}), а также их димеры. Координаты и заряды на атомах (Табл. 1) были получены из *ab initio* расчетов с базисным набором 3-21 G* с помощью РС версии программы GAMESS PC [12] из программного пакета GAMESS (US) QC [13]. Затем в вакууме проводилась повторная оптимизация геометрии мономеров и поиск возможных димеров методом молекулярной механики до значения градиента < 0.1 ккал/моль Å. При оптимизации использовался метод сопряженного градиента (conjugate gradient). Далее оптимизированные в вакууме мономеры или димеры ActII помещались в ячейку, содержащую от 350 до 550 молекул воды (модель TIP3P [14]), и накладывались периодические граничные условия. Для систем, содержащих лиганд

Табл. 1. Заряды на атомах (в а.е.) молекулы ActII. Нумерация атомов указана на Рис.1.

Номер и тип атома	ActII ⁺	ActII ⁺⁺	Номер и тип атома	ActII ⁺	ActII ⁺⁺	Номер и тип атома	ActII ⁺	ActII ⁺⁺
1 С	-0.098109	-0.136704	24 Н	0.113648	0.108089	47 N	-0.166268	-0.154037
2 С	-0.077076	-0.086524	25 N	-0.291338	-0.272204	48 С	-0.112737	-0.112397
3 С	-0.080112	-0.086404	26 Н	0.240723	0.246528	49 С	-0.115832	-0.115442
4 С	-0.080112	-0.009138	27 Н	0.239425	0.246649	50 Н	0.280676	0.274158
5 O	-0.218829	-0.221922	28 O	-0.247389	-0.217203	51 Н	0.111252	0.116818
6 С	-0.155787	-0.134811	29 С	0.361864	0.351358	52 Н	0.117253	0.118169
7 С	0.228045	0.222793	30 O	-0.386633	-0.351355	53 Н	0.117788	0.123960
8 С	0.175182	0.182285	31 Н	0.234551	0.219548	54 Н	0.119398	0.125481
9 С	-0.280001	-0.290413	32 N	-0.322381	-0.348986	55 Н	0.110955	0.116285
10 N	-0.196819	-0.231295	33 С	0.387469	0.386000	56 Н	0.117705	0.118474
11 С	0.117647	0.134853	34 O	-0.466947	-0.457026	57 С	-0.033822	-0.033446
12 С	0.187355	0.165762	35 N	-0.317749	-0.322278	58 Н	0.120005	0.130556
13 С	0.050309	0.051238	36 Н	0.259138	0.253153	59 Н	0.095538	0.106423
14 С	0.149941	0.139689	37 N	-0.153499	-0.104687	60 С	-0.033629	-0.029113
15 С	-0.231356	-0.232975	38 С	-0.109439	-0.111233	61 Н	0.090608	0.124809
16 Н	0.115923	0.121478	39 С	-0.114040	-0.114728	62 Н	0.137595	0.096142
17 Н	0.111015	0.121486	40 Н	0.263863	0.251661	63 С	-0.041787	-0.039913
18 Н	0.113059	0.113789	41 Н	0.116889	0.126698	64 Н	0.097288	0.120743
19 С	-0.235985	-0.237278	42 Н	0.102116	0.129763	65 Н	0.114344	0.125521
20 Н	0.111647	0.123648	43 Н	0.129128	0.130556	66 С	-0.042178	-0.041309
21 Н	0.118310	0.12056	44 Н	0.103359	0.131447	67 Н	0.107125	0.111437
22 Н	0.102409	0.110124	45 Н	0.112406	0.121849	68 Н	0.114719	0.114868
23 Н	0.116267	0.125970	46 Н	0.129452	0.131999	Cl	-0.789546	-

Система «ActII⁺⁺ в чистой воде». Фрагмент системы, включающий ActII⁺⁺ и водородно-связанные с ним молекулы воды, представлен на рис. 2 (в). Этот мономер способен связать 9-10 молекул воды. Центрами гидратации выступают группы O28, O30, O34, HN25, HN32, HN35. Первые три группы связывают по две молекулы воды каждая; остальные - по одной молекуле воды. В растворе существует внутримолекулярная ВС между группами O34 и HN47, обнаруженная в вакууме.

Система «ActII⁺ в чистой воде». Общий вид лиганда ActII⁺ в окружении водородно-связанных молекул воды представлен на рис. 3 (в). Мономер образует ВС с 9-10 молекулами воды при участии групп O5, O30, O34, O28, HN25, HN32, HN35. Более гидратированы группы O28, O30 и O34 – по две молекулы воды, слабее гидратированы O5, HN25, HN32 и HN35 – по одной молекуле воды. Внутримолекулярная ВС при переходе из вакуума в раствор для этой молекулы не сохраняется.

Система «ActII⁺ в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻». Общий вид ActII⁺ с водородно-связанными молекулами воды представлен на рис. 3 (г). Из полученных данных следует, что число молекул воды, связанных этим лигандом, не превышает 5-8. Центрами гидратации служат группы O28, O30, O34, HN35, HN37. Группы

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия кофеина ...

O28 и O34 связывают по две молекулы воды, остальные - по одной. Внутримолекулярные ВС отсутствуют.

Приведенные выше данные говорят о том, что схема гидратации лиганда зависит как от его заряда, так и от присутствия в растворе ионов Na^+ и Cl^- . Так, при добавлении этих ионов общее число водородно-связанных молекул воды для ActII^+ уменьшилось примерно в 1.5 раза.

Отличием лиганда ActII^+ (в чистой воде) от ActII^{++} является возникновение ВС между молекулами воды и группой O5, а также образование водного мостика из одной молекулы воды между группами O34 и HN25. Но общее число молекул воды, связываемых этими лигандами, одинаково. Особенностью структуры ActII^{++} в растворе является внутримолекулярная ВС, которая может препятствовать конформационной подстройке "хвоста" лиганда при его взаимодействии с другими соединениями. Найденные точки гидратации хорошо согласуются с результатами ИК-спектроскопических исследований [17], согласно которым основными центрами гидратации являются группы NH_2 , NH и $\text{C}=\text{O}$.

II. Димеры лиганда ActII. Первоначально поиск энергетически выгодных структур димеров проводился в вакууме. Устойчивых форм ассоциатов ActII^{++} обнаружено не было. Это объясняется сильным электростатическим отталкиванием мономеров, а также ограниченной подвижностью одного из "хвостов" лиганда из-за образования внутримолекулярной ВС.

Два наиболее стабильных типа димера ActII^+ изображены на рис. 4 (а) и рис. 5 (а,б). В димере типа II феноксазоновые кольца лежат в параллельных плоскостях на расстоянии около 3.65 Å друг от друга, что несколько больше расстояния между плоскими ароматическими молекулами в стэкинг димерах - 3.35 - 3.40 Å [18]. Это отличие можно объяснить стерическими ограничениями, которые возникают из-за взаимодействия "хвостов" ActII^+ ; еще одной причиной может быть электростатическое отталкивание этих молекул. В димере типа I феноксазоновые кольца расположены под углом. Оба димера были исследованы как в чистой воде, так и в присутствии ионов Na^+ и Cl^- .

Система «димер ActII⁺ типа I в чистой воде» Структура димера в окружении водородно-связанных молекул воды показано на рис. 4 (б). Он связывает 13-17 молекул воды. Центрами гидратации выступают группы O28, O30 и O34 (по две молекулы воды), а также группы HN32, HN47 (по одной молекуле). В димере возможно образование межмолекулярной ВС между группами O30 и HN37.

Система «димер ActII⁺ типа I в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻». Общее число водородно-связанных с димером молекул воды составляет 8-11 молекул (рис. 4 (в)). Гидратно-активными центрами комплекса являются группы O5, HN47 (по одной молекуле воды) и O28 (две молекулы) для одной из молекул димера, и группы O30, O34, HN25, HN32 и HN47 (по одной молекуле воды) для другой молекулы ActII^+ в димере. Одна молекула воды может занимать мостиковое положение между группами O34 и HN25 одной и той же молекулы лиганда. Возможно образование межмолекулярной ВС между группами O30 и HN37.

Система «димер ActII⁺ типа II в чистой воде» Димер с водородно-связанными молекулами воды показан на рис. 5 (в). Он образует ВС с 9-13 молекулами воды. Центрами гидратации являются группы O28 (по две молекулы воды), и O30, O34, HN25, HN32 (по одной молекуле), а также группа HN37. Возможно возникновение водного мостика из-

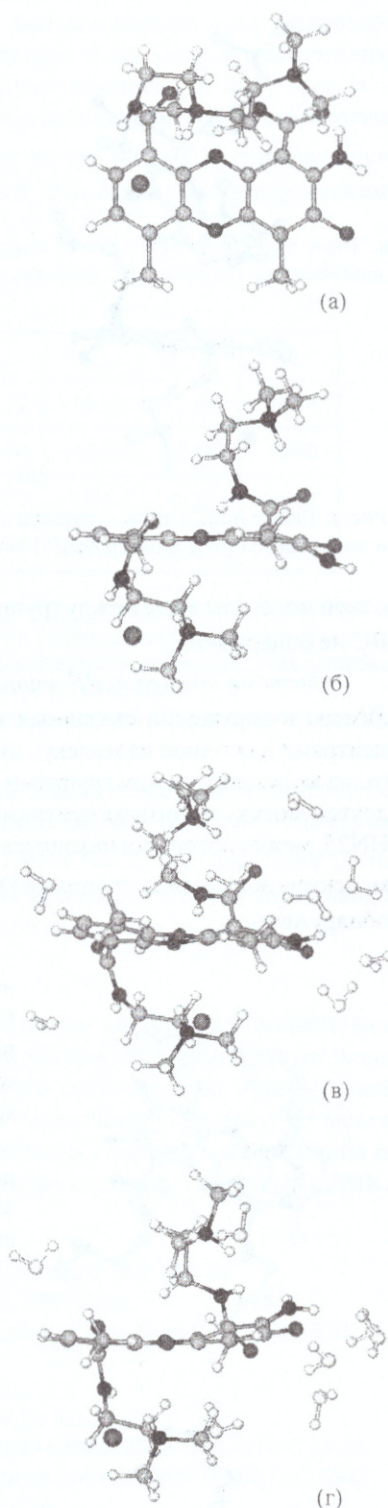


Рис. 3. Молекула ActII^+ : оптимизированная в вакууме структура (а, б); фрагменты систем « ActII^+ в чистой воде» (в) и « ActII^+ в присутствии ионов Na^+ и Cl^- » (г) и водородно-связанные с ActII^+ молекулы воды.

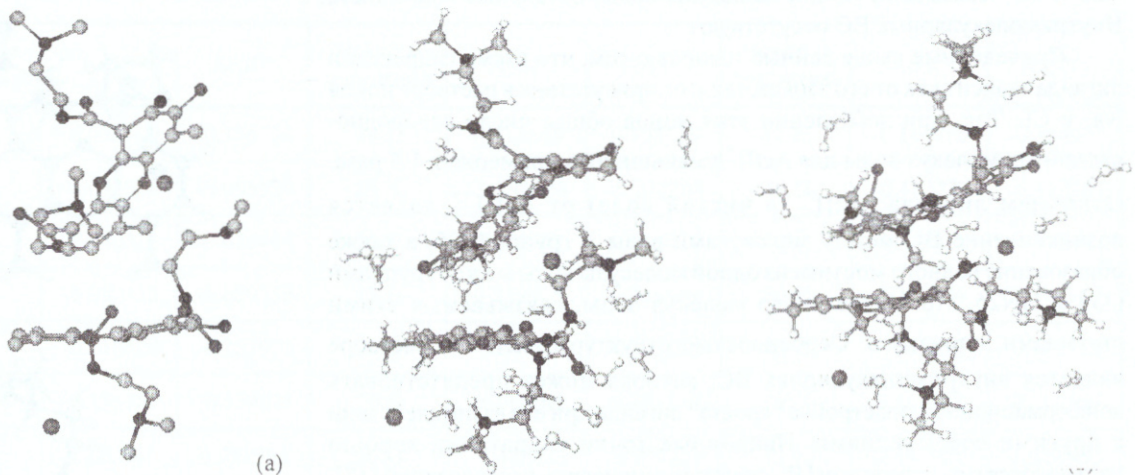
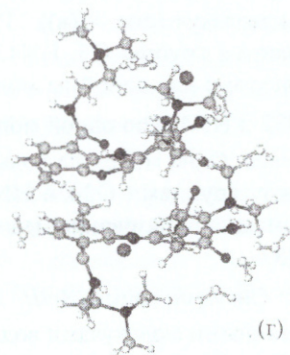
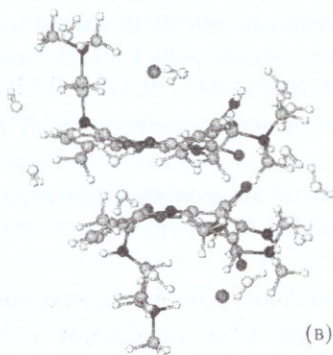
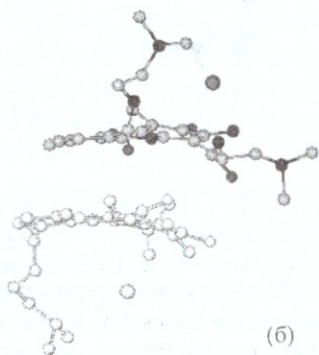
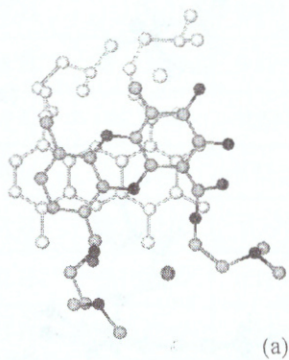


Рис. 4. Димер ActII⁺ I типа: структура в вакууме (атомы водорода не показаны) (а); фрагменты систем «Димер ActII⁺ I типа в чистой воде» (б) и «Димер ActII⁺ I типа в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻» (в) и водородно-связанные с ним молекулы воды.

одной молекулы воды между группами O34 и HN25 в одной из молекул ActII⁺ комплекса. Межмолекулярных ВС не обнаружено.

Система «димер ActII⁺ типа II в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻». На рис. 5 (г) представлена структура димера в окружении связанных молекул воды, число которых не превышает 7-8. Гидратно-активными центрами для одной из молекул димера являются группы O28, HN25 (по две молекулы воды) и группа O30 (одна молекула); между группами O28 и HN25 молекула воды может занимать мостиковое положение. Для другой молекулы димера центрами гидратации являются группы O28 (две молекулы воды), а также O30 и HN25, между которыми находится одна молекула воды. Возможно возникновение водного мостика из одной молекулы воды между группами O34 и HN25 в одной из молекул ActII⁺ комплекса. Межмолекулярных ВС не обнаружено.



Анализ полученных результатов показывает, что наиболее гидратно-активными являются группы O28, O30, O34, менее активна группа HN25. Слабее гидратированы группы HN32, HN37, HN47. Существуют молекулы воды, занимающие мостиковое положение между O34 и HN25 одной и той же молекулы лиганда. Общее число водородно-связанных с димером молекул воды в чистой воде примерно в 1.5 раза больше, чем в системе, содержащей ионы Na⁺ и Cl⁻. По сравнению с мономерами, в димерах возникают два дополнительных центра гидратации - группы HN37 и HN47. Молекул воды, образующих мостики между двумя молекулами лиганда, не обнаружено. В димере типа I может образовываться межмолекулярная ВС.

Рис. 5. Димер ActII⁺ II типа: структура в вакууме (атомы водорода не показаны) (а, б); фрагменты систем «Димер ActII⁺ II типа в чистой воде» (в) и «Димер ActII⁺ II типа в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻» (г) и водородно-связанные с ним молекулы воды.

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия кофеина ...

Анализ сил, стабилизирующих димеры ActII. Рассмотрим энергию взаимодействия молекул в димерах (Табл. 2). Значения общей энергии взаимодействия для всех изученных димеров меньше нуля. Основной вклад в стабилизацию комплексов вносят Ван дер Ваальсовы взаимодействия. Роль электростатических взаимодействий зависит от типа димера: для типа I они стабилизируют комплекс, а для типа II - дестабилизируют. Большее (по абсолютной величине) по сравнению с другими системами значение энергии взаимодействия лигандов в системе «димер ActII⁺ типа I в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻» определяется энергетически выгодным вкладом электростатических взаимодействий. Это вызвано специфическим положением иона Cl⁻, первоначально принадлежащего одной из молекул ActII⁺. Этот ион располагается между положительно заряженными «хвостами» лигандов и одинаково взаимодействует с обеими молекулами ActII⁺. Таким образом, он служит мостиком, стягивающим положительно заряженные «хвосты» двух молекул, и тем самым улучшает энергию их взаимодействия. На возможность непосредственного участия ионов Cl⁻ в образовании димеров указывают и экспериментальные данные [19]. Термодинамическая выгодность димера первого типа может быть связана и с образованием межмолекулярной ВС между группами O34 и HN47.

Табл. 2. Энергия взаимодействия (в ккал/моль) молекул ActII⁺ в димерах и площадь поверхности димеров, доступная для растворителя.

Система	NaCl	U_{tot}	U_{vdw}	$U_{el.stat.}$	S
Димер I типа	нет	-15.72	-15.06	-0.66	1034
	есть	-26.04	-18.66	-7.36	1050
Димер II типа	нет	-13.73	-18.09	4.37	1081
	есть	-14.67	-16.66	2.01	1031

U_{tot} – общая энергия ($U_{tot} = U_{vdw} + U_{el.stat.}$) взаимодействия молекул в димере; U_{vdw} – значение энергии взаимодействий Ван дер Ваальса; $U_{el.stat.}$ – значение электростатической энергии взаимодействия. Ошибка при определении энергии не более 0.7 ккал/моль.

S – площадь поверхности димеров, доступная для растворителя (в Å²).

Оценить роль гидрофобных взаимодействий можно по величине площади поверхности димеров S, доступной для растворителя (Табл. 2). Сравнение значений S со значениями этой величины для мономеров ActII⁺ (669 Å² для системы с чистой водой, и 649 Å² – в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻), показывает, что величина S для димера на ~ 19% меньше, чем для двух не ассоциированных мономеров. То есть образование димера уменьшает площадь поверхности контакта молекул лиганда с водой.

ВЫВОДЫ

Нами получена детальная информация, которая позволяет определить характер взаимодействия антибиотика ActII с молекулами растворителя и ионами растворенных солей. От присутствия ионов в растворе зависит общий заряд и схема гидратации лиганда. Учет этих данных необходим для построения молекулярной модели связывания лиганда ActII с нуклеиновыми кислотами. Центры гидратации указывают на места возможного взаимодействия ActII с атомными группами в желобках двойной спирали, а информация о димеризации ActII необходима для оценки количества молекул ActII в растворе, способных связаться с ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данилов В.И., Слюсарчук О.Н., Полтев В.И. и др. // Биополимеры и клетка, 1991, том 7, №5, с. 5-14
2. Breusegem S.Y., Sadat-Ebrahimi S.E., Douglas K.T. et al // J. Med. Chem. 2001, 44, 2503-2506.
3. Auffinger P., Westhof E. // in: Water management in the design and distribution of quality foods. Ross Y.H., Leslie R.B., and Lillford P.J. - editors. Technomic Publishing Co Inc., Basel, 1999, pp. 165-198
4. Wadkins R.M., Vladu B., Tung Ch.-Sh. // Biochemistry. 1998.V.37. P. 11915-11923.
5. Karawajew L., Glibin E.N., Maleev V.Ya. et al // Anti-Cancer Drug Design. 2000. V.15. P.331-338.
6. Семенов М.А., Гасан А.И., Малеев В.Я. и др. // Вісн.Харк.ун-ту. №488.Біофізичний вісник. 2000. Вип..6(1). С.14-18.
7. Семенов М.А., Сагайдакова Н.Н., Большух Т.В. и др. // Вісн.Харк.ун-ту. №497.Біофізичний вісник. 2000. Вип.2(7). С.16-23.
8. Auffinger P., Westhof E. // Current Opinion in Structural Biology 1998, V. 8 P. 227–236
9. Cheatham T.E. III, Young M.A. // Biopolymers 2000-2001; V. 56, № 4, P. 232-256
10. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al // J. Amer. Chem. Soc., 117, 5179 (1995).
11. Gasteiger J. and Marsili M. // Tetrahedron, 36, 3219-3288 (1980).
12. Granonovsky Alex A., www http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html
13. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al // J. Comput. Chem. 1993. V. 14. P. 1347-1363
14. Jorgensen W.L., Chandrasekhas J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. // J. Chem. Phys. 79:926-935, 1983.
15. Наберухин Ю.И. // Журн. структур. химии. 1984. Т.25. С. 60-67
16. Malenkov G.G., Tytik D.L., and Zheligovskaya E.A. // J. Mol. Liquids 82 (1999), p. 27-38.
17. Березняк Е.Г., Семенов М.А., Большух Т.В. и др. // Вісн.Харк.ун-ту. Направлено в печать.
18. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.- М.: Мир, 1987.- 434 с.
19. Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н. // Вісн.Харк.ун-ту. Направлено в печать.