

МОЛЕКУЛЯРНА БЮФІЗИКА

УДК 577.3

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ
АКТИНОЦИНА С ДНК**
**8. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ГИДРАТАЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ
АКТИНОЦИНА С РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНОЙ АМИНОАЛКИЛЬНЫХ ЦЕПОЧЕК**

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

^{} Харьковский Национальный университет, пл.Свободы, 4, 61077, Харьков*

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

Поступила в редакцию 5 июля 2002 г.

Впервые с помощью квантово-химических расчетов определены равновесные молекулярные структуры и заряды на атомах новосинтезированных производных актиноцина. Методом Монте Карло выполнено компьютерное моделирование гидратации производных актиноцина с различной длиной аминоалкильных цепочек. Результаты моделирования позволяют оценить гидратные свойства исследуемых соединений на молекулярном уровне и сравнить результаты расчетов с имеющимися данными экспериментальных исследований гидратации производных актиноцина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Производные актиноцина, квантово-химические расчеты, гидратация, моделирование методом Монте Карло.

Вода является интегральной частью структуры ДНК. Как минимум два гидратных слоя окружают двойную спираль ДНК, первый из которых содержит не менее 20 молекул воды на нуклеотид [1-3]. В исследованиях последних лет убедительно показано, что гидратно-ионное окружение ДНК существенно зависит от нуклеотидного состава и последовательности пар оснований в двойной спирали ДНК [4-6]. Как следствие этого факта, гидратное окружение должно играть важную роль в процессах белково-нуклеинового узнавания. Изучению этой проблемы посвящено много экспериментальных исследований (например [7,8]). Роль водного окружения в процессах комплексообразования ДНК с малыми лигандами, к которым относится очень важный класс соединений – антибиотики, изучена меньше. В кристаллографических работах зафиксированы молекулы воды, образующие специфические упорядоченные структуры вблизи комплексов динуклеотида dCpG с профлавином [9], олигонуклеотидов с актиномицином D [10] и нетропсином [11]. Применение метода Монте Карло к изучению гидратации комплекса dCpG-профлавин [12] позволило на молекулярном уровне описать структуру гидратного окружения такого комплекса, включающего в себя упорядоченную сеть молекул воды. Экспериментальное исследование участия воды в образовании комплексов ДНК с различными лигандами (профлавин, дауномицин, актиномицин D и др. [13]) показало существенное и различное для всех изученных соединений изменение гидратации ДНК при комплексообразовании.

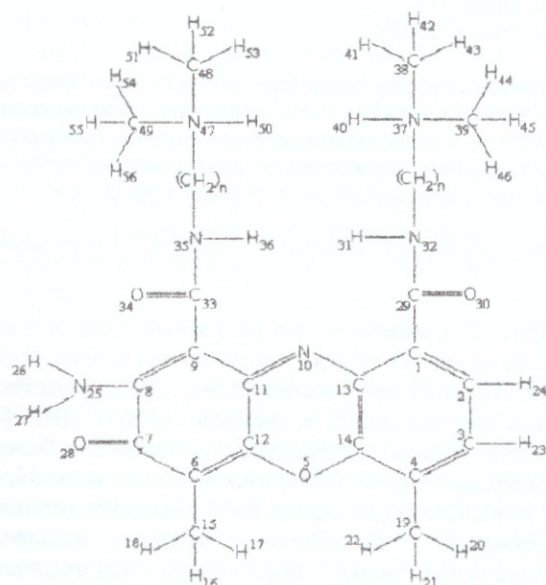
В наших предыдущих статьях, посвященных изучению физических механизмов взаимодействия ДНК и новосинтезированных феноксазоновых антибиотиков (аналогов актиномицина D), получены результаты, указывающие на зависимость физических свойств их комплексов с ДНК от молекулярной структуры лигандов и гидратно-ионного окружения. Спектрофотометрическое и калориметрическое изучение процессов плавления комплексов ДНК с производными актиноцина установили зависимость термодинамических параметров, температуры и интервала переходов спираль-клубок от длины аминоалкильных цепочек боковых радикалов [14,15]. Было также показано, что наибольшую стабильность имеет комплекс ДНК с производным актиноцина, содержащим по две метиленовые группы в боковых цепях.

С помощью ИК-спектроскопического и пьезограмметрического изучения производных актиноцина и их комплексов с ДНК в условиях изменяющейся относительной влажности было установлено, что гидратные свойства как самих лигандов, так и комплексов ДНК-лиганд [16-18], зависят от длины аминоалкильных цепочек производных актиноцина. Так, уровни сорбции молекул воды актиноцинами с различными длинами боковых радикалов существенно различаются. ИК-спектроскопическое исследование увлажненных пленок производных актиноцина и их комплексов с ДНК позволило установить гидратно-активные центры и описать процесс формирования гидратного окружения этих соединений. Кроме того, при изучении спектрофотометрических и термодинамических характеристик синтетических производных актиноцина были получены данные об их различной способности к димеризации, которая определяется как различной ионной силой растворов, так и числом метиленовых групп в боковых радикалах производных актиноцина [19].

Метод молекулярного моделирования, результаты которого приведены в настоящей работе, позволил нам уточнить различие в гидратном окружении производных актиноина, определяемое их молекулярной структурой - количеством метиленовых групп в боковых радикалах. Полученные результаты будут использованы при моделировании комплексов производных актиноина и ДНК с учетом растворителя и для выбора оптимальных моделей таких комплексов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта изучения мы рассматривали производные актиноина с различным числом метиленовых групп в боковых цепочках. Структурная формула с нумерацией атомов приведена на Рис. 1. Координаты и заряды на атомах производных актиноина ActII-ActV были получены методом *ab initio* HF/3-21G(p) с помощью программы GAMESS из программного пакета GAMESS (US) QC [20] в адаптированной для WINNT версии [21]. Заряды на атомах лигандов (в а.е.) даны в Таблице 1, а равновесная геометрия лигандов представлена на Рис. 2.



ActII $n=2$ нумерация атомов - от 57 до 68

ActIII $n=3$ нумерация атомов - от 57 до 74

ActIV $n=4$ нумерация атомов - от 57 до 80

ActV $n=5$ нумерация атомов - от 57 до 86

Рис. 1. Структурная формула производных актиноина.

Использование малого базисного набора для выполнения оптимизации геометрии и получения зарядов на атомах производных актиноина объясняется достаточно большим числом атомов исследуемых соединений, что очень усложняет расчеты для расширенного базиса. В то же время сравнение результатов расчетов, выполненных для фрагментов этих соединений с малым и расширенным базисными наборами, показывают незначительное изменение величины зарядов на атомах. Кроме того, для расчетов, выполненных с базисным набором 3-21G(p), наблюдается хорошее согласие рассчитанных частот ИК-спектров со значениями характеристических частот фрагментов производных актиноина, полученных в аргонных матрицах сотрудником ФТИНТ НАНУ Ивановым А. Использование полуэмпирических методов квантовой химии, обычно применяемых для расчетов электронных свойств достаточно больших молекул, дало неудовлетворительные значения частот и интенсивностей характеристических полос ИК-спектра.

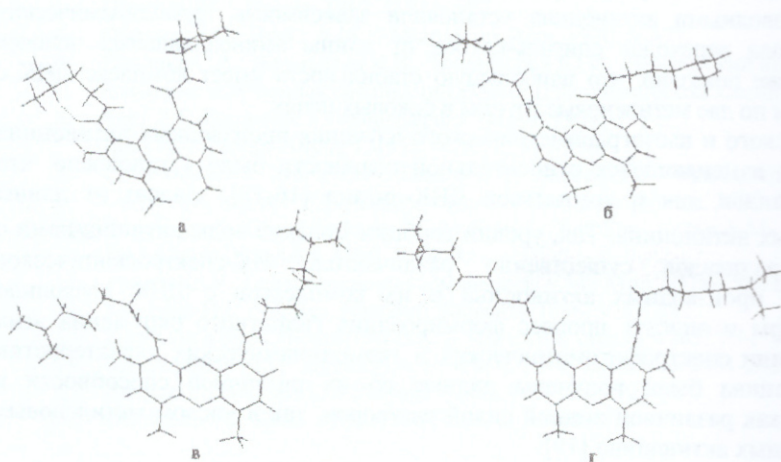


Рис. 2. Молекулярные структуры производных актиноина, полученные методами квантовой химии: а - ActII, б - ActIII, в - ActIV, г - ActV.

Внутримолекулярная водородная связь между атомами O_{24} и H_{30} ActII (а) показана пунктиром.

Как видно из данных, приведенных в Таблице 1, заряды на атомах лиганда с двумя метиленовыми группами в боковых цепях (ActII) отличаются от зарядов атомов остальных лигандов этого ряда. Особенностью структуры ActII является существование внутримолекулярной водородной (H-) связи между группами $C_{33}=O_{34}...H_{50}-N_{47}$ (Рис.2а). Наиболее существенные отличия наблюдаются для атомов, образующих внутримолекулярную водородную связь (N_{47}, H_{50} и O_{34}), атомов карбонильной группы $C_{29}=O_{30}$. Обнаружено перераспределение зарядов атомов колец хромофора ($C_1, C_4, C_6, C_8, C_9, N_{10}, C_{11}, C_{13}$). Найдена тенденция к существенному уменьшению заряда на атомах углерода, расположенных у четвертичных азотов N_{37} и N_{47} , которая сохраняется независимо от длины аминокислотной цепочки (атомы C_{60} и C_{66} ActII; атомы C_{69} и C_{72} ActIII; C_{75} и C_{78} ActIV; атомы C_{81} и C_{84} ActV).

Таблица 1. Заряды на атомах производных актиноцина. Нумерация атомов указана на Рис. 1.

Тип и номер атома	ActII	ActIII	ActIV	ActV	Тип и номер атома	ActII	ActIII	ActIV	ActV
C1	-0.136704	-0.0955	-0.1001	-0.0955	H44	0.131447	0.1289	0.1298	0.1298
C2	-0.086524	-0.0724	-0.0946	-0.0979	H45	0.121849	0.1265	0.1288	0.1292
C3	-0.086404	-0.0722	-0.0785	-0.0830	H46	0.131999	0.1288	0.0828	0.1281
C4	-0.009138	-0.0344	-0.0312	-0.0389	N47	-0.154037	-0.0998	-0.1032	-0.1049
O5	-0.221922	-0.2174	-0.2135	-0.2223	C48	-0.112397	-0.1122	-0.1114	-0.1129
C6	-0.134811	-0.1587	-0.1670	-0.1579	C49	-0.115442	-0.1138	-0.1150	-0.1130
C7	0.222793	0.2275	0.2320	0.2309	H50	0.274158	0.2536	0.2539	0.2518
C8	0.182285	0.1044	0.1181	0.1142	H51	0.116818	0.1308	0.1308	0.1298
C9	-0.290413	-0.2223	-0.2256	-0.2326	H52	0.118169	0.1281	0.1280	0.1271
N10	-0.231295	-0.1680	-0.1281	-0.1589	H53	0.123960	0.1313	0.1296	0.1277
C11	0.134853	0.0846	0.0890	0.0954	H54	0.125481	0.1307	0.1299	0.1278
C12	0.165762	0.1773	0.1875	0.1760	H55	0.116285	0.1279	0.1262	0.1268
C13	0.051238	0.0055	0.0334	0.0245	H56	0.118474	0.1309	0.1336	0.1298
C14	0.139689	0.1491	0.1467	0.1466	C57	-0.033446	-0.0049	-0.0260	-0.0197
C15	-0.232975	-0.2346	-0.2298	-0.2353	H58	0.130556	0.1033	0.1012	0.1124
H16	0.121478	0.1111	0.1090	0.1014	H59	0.106423	0.0904	0.0820	0.0769
H17	0.121486	0.1183	0.1156	0.1121	C60	-0.029113	-0.2037	-0.1668	-0.1675
H18	0.113789	0.1138	0.1087	0.1160	H61	0.124809	0.1235	0.1055	0.0958
C19	-0.237278	-0.2360	-0.2462	-0.2323	H62	0.096142	0.0990	0.0980	0.0832
H20	0.123648	0.1172	0.1140	0.1131	C63	-0.039913	-0.0159	-0.0256	-0.0233
H21	0.12056	0.1073	0.1130	0.1114	H64	0.120743	0.1048	0.0971	0.1145
H22	0.110124	0.1138	0.1158	0.1090	H65	0.125521	0.0895	0.0946	0.0891
H23	0.125970	0.1204	0.1172	0.1141	C66	-0.041309	-0.2031	-0.1674	-0.1673
H24	0.108089	0.1220	0.1093	0.1096	H67	0.111437	0.1148	0.1001	0.0879
N25	-0.272204	-0.3510	-0.3556	-0.3528	H68	0.114868	0.0952	0.0957	0.0813
H26	0.246528	0.2213	0.2050	0.2317	C69		-0.0269	-0.1821	-0.1590
H27	0.246649	0.2305	0.2309	0.2093	H70		0.1169	0.1054	0.0925
O28	-0.217203	-0.2676	-0.2796	-0.2629	H71		0.1113	0.0993	0.0958
C29	0.351358	0.3429	0.3388	0.3326	C72		-0.0286	-0.1914	-0.1603
O30	-0.351355	-0.3670	-0.3280	-0.3161	H73		0.1192	0.1182	0.1122
H31	0.219548	0.2330	0.2173	0.2108	H74		0.1132	0.0903	0.0945
N32	-0.348986	-0.3089	-0.3380	-0.3383	C75			-0.0251	-0.1780
C33	0.386000	0.3344	0.3362	0.3383	H76			0.1179	0.1018
O34	-0.457026	-0.3104	-0.3249	-0.3296	H77			0.1166	0.0977
N35	-0.322278	-0.3404	-0.3557	-0.3388	C78			-0.0210	-0.1805
H36	0.253153	0.2152	0.2093	0.2134	H79			0.1158	0.0958
N37	-0.104687	-0.0994	-0.1006	-0.1029	H80			0.1149	0.0931
C38	-0.111233	-0.1137	-0.1152	-0.1142	C81				-0.0234
C39	-0.114728	-0.1140	-0.1148	-0.1124	H82				0.1173
H40	0.251661	0.2547	0.2570	0.2536	H83				0.1154
H41	0.126698	0.1267	0.1293	0.1294	C84				-0.0208
H42	0.129763	0.1302	0.1270	0.1290	H85				0.1164
H43	0.130556	0.1319	0.1281	0.1283	H86				0.1209

Молекулярное моделирование гидратации производных актиноцина в водных кластерах выполнено с помощью метода Монте Карло. Применение этого метода для изучения гидратации компонентов нуклеиновых кислот и биологически активных веществ подробно описано ранее (например, [22,23]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты моделирования гидратации производных актиноцина с различной длиной аминокислотных цепочек, выполненные методом Монте Карло, приведены в Таблице 2 и на Рис.3-6.

Таблица 2. Энергетические характеристики систем лиганд-вода и «чистая вода» (*) (в ккал/моль).

System	U_{tot}	U_{wwl}	U_{wl}	$N_{\text{H}_2\text{O}}$
Act II	-8.607 ± 0.005	-8.364	-194.4	9-10
Act III	-8.627 ± 0.005	-8.335	-233.2	19-20
Act IV	-8.632 ± 0.005	-8.327	-244.4	18-19
Act V	-8.600 ± 0.005	-8.300	-240.3	15-16
H_2O^*	-8.490 ± 0.005	-8.490	-	-

В Таблице 2 представлены средние значения полной потенциальной энергии системы U_{tot} , энергии взаимодействия вода-вода U_{wwl} (обе величины приведены в пересчете на одну молекулу воды), энергия взаимодействия вода-лиганд U_{wl} (в пересчете на 800 молекул воды), $N_{\text{H}_2\text{O}}$ – среднее число молекул воды, образующих водородные связи с производными актиноцина. Также приведены значения статистической ошибки для значений полной потенциальной энергии.

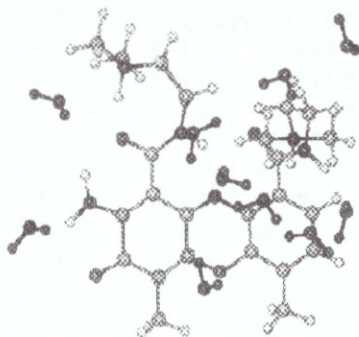


Рис.3. Лиганд ActII и молекулы воды, образующие с ним Н-связи.

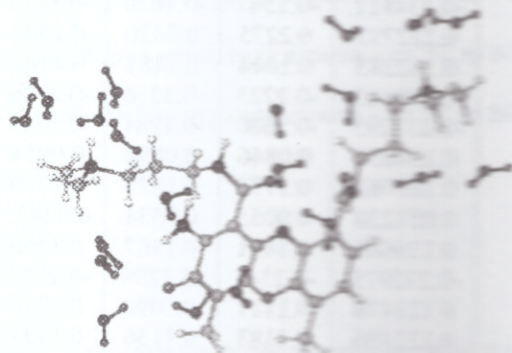


Рис.4. Лиганд ActIII и молекулы воды, образующие с ним Н-связи.

Как видно из сравнения величин полной потенциальной энергии систем U_{tot} , наиболее энергетически выгодной является система, содержащая лиганд ActIV. Такая предпочтительность определяется взаимодействием ActIV с водой - значением энергии U_{wl} , которое максимально (по абсолютной величине) для ActIV. При этом значения $N_{\text{H}_2\text{O}}$, которые определяют наиболее сильно связанные с лигандом молекулы воды, или первый гидратный слой, для ActIII и для ActIV практически одинаковы и больше, чем для ActII и ActV. Такие результаты могут быть объяснены формированием более протяженной вторичной гидратной оболочки у ActIV, в которой молекулы воды, не попавшие в первую гидратную оболочку, формируют упорядоченный слой молекул растворителя, связанный с молекулами воды первого гидратного слоя. Этот факт согласуется с данными пьезограмметрического изучения сорбции воды на пленках производных актиноцина [18]. Согласно изотермам гидратации сорбция воды пленками, содержащими ActIV, максимальна для четырех изученных лигандов ActII-ActV.

Данные Таблицы 2 также позволяют утверждать, что увеличение длины аминокислотных цепочек у производных актиноцина вызывает разрушение структуры растворителя - уменьшение (по абсолютной величине) значений энергии взаимодействия вода-вода U_{wwl} .

Анализ мгновенных конфигураций (Рис.3-6) позволяет определить положения молекул воды, образующих водородные связи с производными актиноцина. Число молекул воды, образующих водородные связи с ActII наименьшее (Таблица 2, значения $N_{\text{H}_2\text{O}}$). Две донорно-акцепторные группы лиганда ActII ($\text{C}_{33}=\text{O}_{34}$ и $\text{N}_{47}-\text{H}_{50}$) связаны внутримолекулярной Н-связью, поэтому они не принимают участия в образовании водородных связей с молекулами растворителя. Молекулы воды занимают мостиковые положения между четвертичными азотами (N_{37} , N_{47}) и донорно-акцепторными группами феноксазонового хромофора (O_5 , $\text{C}_{29}=\text{O}_{30}$, $\text{N}_{32}-\text{H}_{31}$), которые не вовлечены в образование внутримолекулярной водородной связи (Рис.3). Такие мостиковые положения молекул воды возможны только для ActII, так как он имеет наименьшую длину аминокислотных цепочек. Поэтому расстояния между четвертичными азотами обеих аминокислотных цепочек и соответствующими гидратно-активными центрами феноксазонового хромофора ActII позволяют молекулам воды занять мостиковые положения между двумя центрами гидратации.

Центрами гидратации ActIII - ActV являются два четвертичных азота, которые гидратируются пятью (ActIII и ActIV) или четырьмя (ActV) молекулами воды. Остальные связанные молекулы воды образуют водородные связи с донорно-акцепторными карбонильными и аминогруппами феноксазонового хромофора (Рис.4,5).

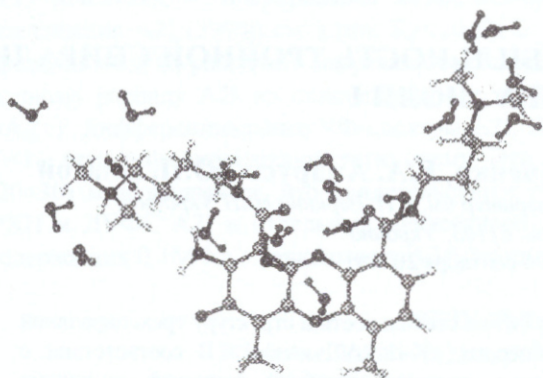


Рис. 5. Лиганд Act IV и молекулы воды, образующие с ним Н-связи.

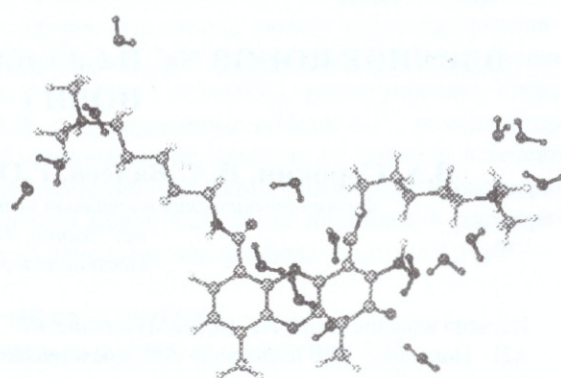


Рис. 6. Лиганд ActV и молекулы воды, образующие с ним Н-связи.

Согласно данным ИК-спектроскопического изучения процесса увлажнения пленок актиноциновых производных, основными центрами гидратации ActII-ActV являются C=O, NH₂ и NH-группы [16,17]. Следовательно, данные моделирования согласуются с результатами экспериментальных исследований.

Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие о зависимости гидратных свойств производных актиноцина от числа метиленовых групп в боковых цепях. Увеличение длины боковых заместителей приводит к разрушению структуры растворителя и увеличению гидратной оболочки всех изученных лигандов. При этом первая гидратная оболочка, или число молекул воды, образующих водородные связи с молекулами лиганда, резко возрастает при увеличении *n* с 2 до 3 и изменяется незначительно для ActIII-ActV. Вторичная гидратная оболочка, или внешний слой молекул воды, увеличивается для ActIII и ActIV и незначительно уменьшается у ActV. Особенности взаимодействия ActII с водным окружением определяются образованием внутримолекулярной водородной связи. Такая молекулярная структура лиганда ActII и определяемое ею специфическое взаимодействие с растворителем может быть причиной специфического взаимодействия ActII и ДНК. Следовательно, ActII может иметь иную биологическую активность по сравнению с остальными изученными производными актиноцина.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке по программе INTAS'97, грант 31753.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schneider B., Cohen D., Berman H.M. // *Biopolymers*. 1992. V.32? P.725-750.
2. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Каппур В.А. // *Биофизика*. 1993. Т. 38. № 5. С. 768-790.
3. Semenov M.A., Bereznyak E.G. // *J.Comments on Mol.Cell.Biophys.* 2000. V.1, N1, P.1-23.
4. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Maleev V.Ya. // *Journal Mol.Struct.*, 1997. V.408/409. P.213-217.
5. Shui X., Sines C.C., McFail-Isom L., Van Derveer D., Williams L.D. // *Biochemistry*. 1998. V.37. P.16877-16887.
6. Гасан А.И., Вирник К.М., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. // *Биофизика*. 2002. Т.47. № 3. С. 420-426.
7. Vossen K.M., Wolz R., Daugherty M.A., Fried M.G. // *Biochemistry*. 1997. V.36. P.11640-11647.
8. Wenner J.R., Bloomfield V.A. // *J.Biomol.Struct.Dyn.* 1999. V.17. P.461-471.
9. Shien H.S., Berman H.M., Dabrow M., Neidle S. // *Nucl.Acids Res.* 1980. V.8. N 1. P.85-97.
10. Takusagawa F.T., Carlson R.G., Weaver R.F. // *Bioorg.Med.Chem.* 1997. V.5, P.1197-1203.
11. Balendiran K., Rao S.T., Sekharudu C.Y., Zon G., Sundaralingam M. // *Acta crystallogr. sect.D.* 1995. V.51. N 1. P.190-200.
12. Resat H., Mezei M. // *Biophys.J.* 1996. V.71. N3. P.1179-1190.
13. Qu X., Chaires J.B. // *J.Amer.Chem.Soc.* 2001. V.123.N 1. P.1-7.
14. Березняк Е.Г., Зигченко Н.А. и др. // *Вісник ХДУ, № 528, Біофізичний вісник, вип. 9, 2001 (2), P. 40-44*
15. Круглова Е. Б. и др. // *Вісник ХДУ, № 560, Біофізичний вісник, вип.10, 2002 (1), P.21-29.*
16. Сагайдакова Н. и др. // *Вісник ХДУ, № 497, Біофізичний вісник, вип.7, 2000 (2), P.16-23.*
17. Духопельников Е.В. и др. // *Вісник ХДУ, № 528, Біофізичний вісник, вип. 9, 2001 (2), P 33-39.*
18. Больбух Т.В. и др. // *Вісник ХДУ, № 560, Біофізичний вісник, вип.10, 2002 (1), P.30-35.*
19. Круглова Е.Б. и др. // *Вісник ХДУ, № 560, Біофізичний вісник, вип.10, 2002 (1), P. 12-20.*
20. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. and oth. // *J.Comput.Chem.* 1993. V.14. P.1347-1363.
21. Granovsky Alex A., www <http://classic.chem.msu.su/gran/games/index.html>
22. Данилов В.И., Слосарчук О.Н., Полтев В.И. и др. // *Биополимеры и клетка*. 1991. Т.7. № 5. С. 5-14.
23. Шестопалова А.В., Анищенко Д.Б., Малеев В.Я. // *Вісн. ХДУ, № 450, Біофізичн. вісн., вип. 4, 1999, с. 17-22.*