

УДК 577.32

**РАСЧЕТ ИЗМЕНЕНИЯ КОНФИГУРАЦИОННОЙ ЭНТРОПИИ  
ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ В МАЛУЮ КАНАВКУ ДНК****В.В. Костюков, М.П. Евстигнеев***Севастопольский национальный технический университет,  
ул. Университетская, 33, Севастополь, 99053, Украина*

Поступила в редакцию 18 июня 2010 г.

Принята 30 сентября 2010 г.

Методами молекулярного моделирования проведено вычисление энергетических эквивалентов изменения трансляционных, ротационных, вибрационных степеней свободы и внутреннего вращения (ротамерии) 10 лигандов при комплексообразовании с малой канавкой двуспиральной ДНК. Показано, что потеря поступательных, вращательных и высокочастотных колебательных (колебания химических связей) степеней свободы является энергетически существенно невыгодным. В то же время, низкочастотные остаточные колебания в комплексе значительно стабилизируют его. Вклад конформационной энтропии, обусловленной ротамерией, является незначительным и не превышает 2 ккал/моль.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** малая канавка, степени свободы, внутреннее вращение, конфигурационная энтропия

**РОЗРАХУНОК ЗМІНИ КОНФІГУРАЦІЙНОЇ ЕНТРОПІЇ  
ПРИ ЗВ'ЯЗУВАННІ ЛІГАНДУ У МАЛУ КАНАВКУ ДНК****В.В. Костюков, М.П. Євстигнєєв***Севастопольський національний технічний університет, вул. Університетська, 33, Севастополь, 99053, Україна*

Методами молекулярного моделювання проведено обчислення енергетичних еквівалентів зміни трансляційних, ротаційних, вібраційних ступенів свободи і внутрішнього обертання (ротамерії) 10 лігандів при комплексоутворенні з малою канавкою двоспиральної ДНК. Показано, що втрата поступальних, обертальних і високочастотних коливальних (колювання хімічних зв'язків) ступенів свободи є енергетично істотно невигідною. У той же час, низькочастотні залишкові колювання у комплексі значно стабілізують його. Внесок конформаційної ентропії, зумовленої ротамерією, є незначним і не перевищує 2 ккал/моль.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** мала канавка, ступені свободи, внутрішнє обертання, конфігураційна ентропія

**CALCULATION OF CONFIGURATIONAL ENTROPY CHANGE  
ON LIGAND BINDING WITH DNA MINOR GROOVE****V.V. Kostjukov, M.P. Evstigneev***Sevastopol National Technical University, Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 99053, Ukraine*

Calculation of change of energetic equivalents of translational, rotational, vibrational degrees of freedom and internal rotation (rotamery) for 10 ligands on their complexation with minor groove of double-stranded DNA was performed by molecular modeling methods. It is shown that the loss of translational, rotational and high-frequency vibrational (vibrations of chemical bonds) degrees of freedom is considerably energetically unfavorable. At the same time, the residual low-frequency vibrations in the complex considerably stabilize it. The contribution of conformational entropy due to rotamery is insignificant and does not exceed 2 kcal/mol.

**KEY WORDS:** minor groove, degrees of freedom, internal rotation, configurational entropy

Класс низкомолекулярных соединений, проявляющих свое биологическое действие путем связывания в малую канавку ДНК (Minor Groove Binders, далее по тексту - MGB), в последнее десятилетие привлекает к себе пристальное внимание в качестве потенциальных молекул-субстратов для направленного синтеза лекарственных препаратов с предсказуемой фармакологической активностью (см. обзоры [1,2]). Это обусловлено, с одной стороны, высокой избирательностью связывания молекул MGB с полинуклеотидной последовательностью по сравнению, например, с традиционно ис-

пользуемыми в химиотерапии рака ароматическими интеркаляторами в ДНК, а с другой стороны – ярко выраженной кооперативностью комплексообразования с ДНК некоторых представителей класса MGB [3-5]. Считается, что медико-биологические свойства препаратов на основе MGB и их структурно-термодинамические параметры связывания с биорецептором являются взаимосвязанными. В связи с этим ключевым элементом стратегии дизайна новых MGB-лигандов с управляемым медико-биологическим эффектом является разработка соединений с заданным термодинамическим профилем комплексообразования с ДНК. Последнее, в свою очередь, требует детального знания вклада различных физических факторов в полную энергию Гиббса связывания MGB с ДНК в физиологических условиях.

Ранее многими авторами были осуществлены попытки разделения полной энергии Гиббса на составляющие [6-8], однако успешный с точки зрения совпадения с экспериментом результат был получен лишь для отдельных представителей класса MGB, причем с использованием различных вычислительных методик. Не вдаваясь далее в анализ этих результатов отметим, что, по-видимому, наиболее проблематичным является расчет энтропийных составляющих полной энергии Гиббса (см. обзор [9] и ссылки в нем). Как правило, большинство авторов к составляющим преимущественно энтропийной природы относят гидрофобный вклад  $\Delta G_{\text{hyd}}$  и энергетический эквивалент изменения конфигурационной энтропии  $\Delta G_{\text{config}}$ . Расчет  $\Delta G_{\text{hyd}}$  чаще всего производится однотипно через изменение доступной для растворителя площади поверхности (см., например, [7,8]), в то время как расчет  $\Delta G_{\text{config}}$  представляет наибольшую сложность (см.обсуждение ниже). Кроме этого, существуют основания полагать, что изменение конфигурационной энтропии не только является систематической добавкой к полной энергии Гиббса связывания MGB с ДНК, но и лежит в основе специфического физического механизма, обеспечивающего кооперативность связывания с ДНК некоторых соединений группы MGB [10].

Целью настоящей работы является расчет составляющей  $\Delta G_{\text{config}}$  полной энергии Гиббса, обусловленной изменением конфигурационной энтропии (далее по тексту – конфигурационная энтропия) при комплексообразовании 10 различных лигандов, связывающихся в малую канавку ДНК.

## МЕТОДЫ

Пространственные структуры MGB-лигандов (рис. 1) взяты из Protein Data Bank [11] (беренил (а), PDB ID 2GVR, DAPI (б) 432D, DB293 (в) 2I2I, дистамицин А (г) 2JT7, DB75 (фурамин, д) 227D, Хоекст33258 (е) GDL026, нетропсин (ж) 101D, пентамин (з) 1D64, пропамидин (и) 1PRP, SN6999 (к) 144D).

Поскольку исследуемые лиганды проявляют наибольшее сродство к АТ-сайтам ДНК, занимая приблизительно 4 пары оснований при укладке в малый желобок [1], в качестве рецептора был выбран несамокомплементарный додекамер ДНК d(CGCA<sub>4</sub>GCG)/(CGCT<sub>4</sub>GCG). Пространственная структура дуплекса В-ДНК построена с помощью программы HyperChem 8.0 (Hypercube, Inc., Toronto, Canada). Конформация додекамера соответствовала В-форме ДНК. Пространственная структура комплексов MGB-ДНК построена методом молекулярной механики с помощью программы X-PLOR, версия 3.1 [12]. Значения ван-дер-ваальсовых радиусов и зарядов для атомов ДНК, использованных в настоящей работе, а также параметры атом-атомных взаимодействий соответствуют силовому полю AMBER для нуклеиновых кислот [13]. Атомные заряды лигандов вычислялись при помощи пакета Gaussian03W методом Мерца-Коллмана на уровне теории MP2/6-31G\* [14].

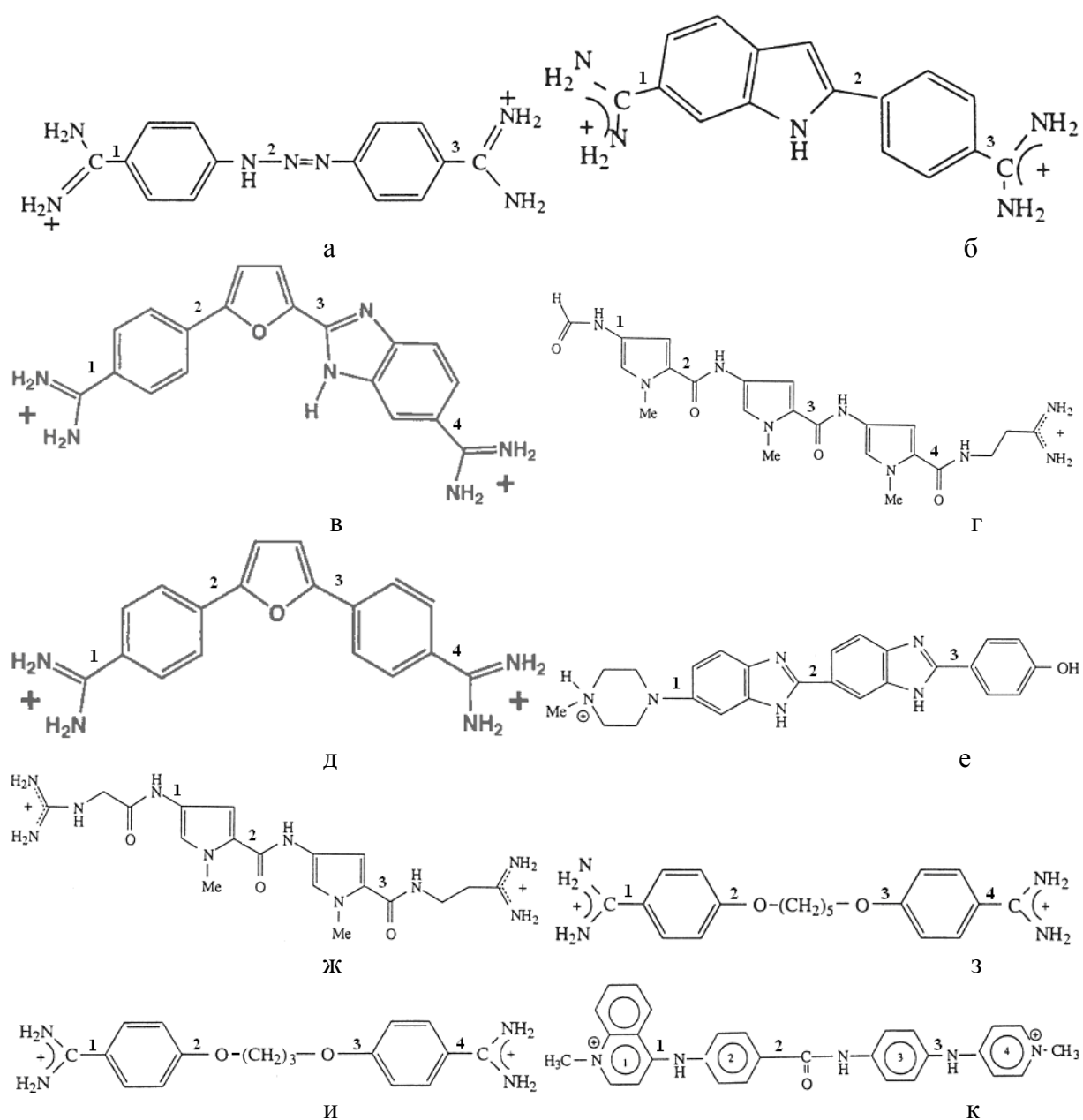


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых MGB-лигандов (цифрами отмечены связи, относительно которых производилось вращение)

Вращение ароматических групп MGB вокруг соединяющих их одинарных химических связей (либо совокупности одинарных связей) и вычисление энергии внутримолекулярных взаимодействий  $U$  в зависимости от угла поворота  $\varphi$  между ароматическими кольцами проводилось в программе X-PLOR. Расчет частот высокочастотных колебаний химических связей MGB, ДНК и их комплексов (для использования в формулах (5)) проводился методом молекулярной механики Dreiding в Gaussian. Вычисление частот низкочастотных механических остаточных колебаний в комплексе (для использования в формуле (6)) в приближении гармонического осциллятора выполнялось в X-PLOR путем расчета зависимости энергии межмолекулярных взаимодействий  $U$  от малых (до 0.5 Å) смещений лиганда вдоль каждой из трех координатных осей [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Общий подход к расчету конфигурационной энтропии

Условно методы расчета  $\Delta G_{\text{config}}$  можно разделить на две группы:

1. Расчет методами молекулярной динамики [16] или Монте-Карло [17]. Эта группа методов дает наиболее точный результат, в частности, неявно учитывает ангармоничность колебаний атомов, однако требует длительных времен эволюции для исключения зависимости величины энтропии от времени: для класса МГВ-лигандов это порядка 3-5 нс в зависимости от типа молекулы и без учета изменения конфигурации ДНК [18]. При этом некоторые авторы полагают [19,20], что надежный расчет конфигурационной энтропии методами молекулярного моделирования для систем типа Лиганд-ДНК/Белок в настоящее время едва ли вообще достижим.
2. Декомпозиция  $\Delta G_{\text{config}}$  на составляющие – уравнение (1) – и расчет каждой составляющей по отдельности [9,21].

$$\Delta G_{\text{config}} = \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{vib}} + \Delta G_{\text{conf}}, \quad (1)$$

где  $\Delta G_{\text{tr}}$ ,  $\Delta G_{\text{rot}}$ ,  $\Delta G_{\text{vib}}$ ,  $\Delta G_{\text{conf}}$ , соответственно, изменения энергии Гиббса за счет изменения трансляционных, ротационных, вибрационных степеней свободы, и изменение конформации взаимодействующих молекул.

Энтропийная составляющая конформационных изменений  $\Delta G_{\text{conf}}$  (не следует путать ее с энергией адаптации лиганда и ДНК в комплексе, носящей преимущественно энтальпийный характер) обычно сводится к изменению числа ротамеров лиганда при комплексообразовании [22]:

$$\Delta G_{\text{conf}} = -RT \sum_{j=1}^n p_j \ln p_j, \quad p_j = \frac{\exp\left(-\frac{E_j}{RT}\right)}{\sum_{j=1}^n \exp\left(-\frac{E_j}{RT}\right)}, \quad (2)$$

где  $E_j$  – минимум энергии  $j$ -й конформации лиганда;  $n$  – число стабильных ротамеров.

Чаще всего расчет составляющих  $\Delta G_{\text{tr}}$ ,  $\Delta G_{\text{rot}}$  производится по модели «идеального газа» (см. обзор проблемы и вывод соотношений (3),(4) в работе [15]):

$$\Delta H_{\text{tr}} = -\frac{3}{2} RT, \quad \Delta S_{\text{tr}} = -R \left[ \frac{5}{2} + \frac{3}{2} \ln \frac{2\pi m_{N_2} m_D kT}{(m_{N_2} + m_D) h^2} - \ln \frac{N_A}{V} \right], \quad \Delta G_{\text{tr}} = \Delta H_{\text{tr}} - T\Delta S_{\text{tr}}, \quad (3)$$

$$\Delta H_{\text{rot}} = -\frac{3}{2} RT, \quad \Delta S_{\text{rot}} = -R \left[ \frac{3}{2} + \frac{1}{2} \ln \frac{\pi I_x^{N_2} I_y^{N_2} I_z^{N_2} I_x^D I_y^D I_z^D}{I_x^{DN_2} I_y^{DN_2} I_z^{DN_2}} + \frac{3}{2} \ln \frac{8\pi^2 kT}{h^2} \right], \quad \Delta G_{\text{rot}} = \Delta H_{\text{rot}} - T\Delta S_{\text{rot}} \quad (4)$$

где  $m_{N_2}$ ,  $m_D$  – массы ДНК и лиганда соответственно;  $I$  – моменты инерции относительно координатных осей  $x, y, z$  для лиганда ( $D$ ), ДНК ( $N_2$ ) и их комплекса ( $DN_2$ );  $T=300\text{K}$ ;  $V=10^{-3} \text{ м}^3$ ;  $N_A$ ,  $h$ ,  $k$ ,  $R$  – постоянные Авогадро, Планка, Больцмана, газовая постоянная, соответственно.

Подход (3),(4) был подвергнут серьезной критике в работах [9,23], в частности, по причине того, что полная потеря степеней свободы («замораживание» лиганда в комплексе) при невалентном комплексообразовании невозможна. Однако, если остаточные движения лиганда в комплексе учтены, то модель «идеального газа» корректно описывает конфигурационную энтропию взаимодействующих молекул в растворе [9,21,24]. Учет остаточных движений в комплексе реализуется в настоящее время двумя основными способами: путем расчета объема, доступного для лиганда в составе комплекса (см. обзор метода в [9]), и путем введения низкочастотных механических вибраций лиганда в комплексе (см. обзор метода в [15]). Отметим, что четкой методики оценки доступного для лиганда объема в сайте связывания на сегодняшний день не существует; оценка производится либо эмпирически (как, например, в [25]), либо по данным рент-

геноструктурного анализа [26]. С другой стороны, механические вибрации MGB-лиганда (второй способ), удерживаемого водородными связями в малой канавке, физически вполне возможны, что, например, подтверждается существованием остаточных вибраций в комплексах простых молекул, стабилизированных Н-связями [27]. Кроме этого, второй метод был ранее успешно применен для разделения экспериментальной энергии Гиббса различных типов нековалентного комплексообразования с участием класса ароматических лигандов [28,29], в связи с чем был использован в настоящей работе для расчета составляющих конфигурационной энтропии при связывании молекул MGB с ДНК.

Таблица 1. Расчетные параметры ротамеров MGB

Лиганд	№ <sup>1)</sup> связи <i>i</i>	Высота барьера, $\Delta U_i$ , ккал/моль		Крутильные колебания		Число <sup>2)</sup> ротамеров
		Min1	Min2	$\nu_i$ , ТГц	$\Delta G_i$ , ккал/моль	
Беренил	1	2.5	2.5	10.0	0.58	4
	2	2.3	-	2.13	-0.13	
	3	2.5	2.5	10.0	0.58	
DAPI	1	2.5	2.5	10.0	0.58	8
	2	3.3	3.3	5.59	0.32	
	3	2.5	2.5	10.0	0.58	
DB293	1	2.5	2.5	10.0	0.58	8
	2	5.6	-	2.08	-0.15	
	3	1.7	6.6	4.06	0.18	
	4	2.5	2.5	10.0	0.58	
Дистамицин А	1	2.7	2.7	8.65	0.42	16
	2	1.0	9.3	6.04	0.36	
	3	0.7	10.2	1.78	-0.23	
	4	4.5	1.2	2.91	0.02	
Фурамин (DB75)	1	2.5	2.5	10.0	0.58	4
	2	1.6	1.6	4.40	0.22	
	3	1.6	1.6	4.40	0.22	
	4	2.5	2.5	10.0	0.58	
Хоекст 33258	1	5.5	4.5	6.51	0.39	8
	2	3.7	1.0	1.83	-0.21	
	3	1.2	1.8	4.21	0.20	
Нетропсин	1	5.8	3.2	4.06	0.18	8
	2	3.8	1.9	1.54	-0.30	
	3	17.1	1.3	3.93	0.16	
Пентамин	1	2.5	2.5	10.0	0.58	4
	2	18	18	1.38	0.75	
	3	18	18	1.38	0.75	
	4	2.5	2.5	10.0	0.58	
Пропамин	1	2.5	2.5	10.0	0.58	4
	2	1.8	1.8	6.35	0.38	
	3	1.8	1.8	6.35	0.38	
	4	2.5	2.5	10.0	0.58	
SN6999	1	27	24	6.39	0.38	8
	2	34	27	1.47	-0.33	
	3	3.7	1.2	15.2	0.81	

Примечания: <sup>1)</sup> рассматривались одинарные связи, соединяющие гетероциклы лиганда (нумерация связей указана на рис. 1); <sup>2)</sup> оценка числа возможных ротамеров производилась визуально путем выставления значений внутренних углов, соответствующих минимумам энергии, с исключением неразличимых ротамеров

Суть метода [15] заключается в выделении в структуре полной вибрационной энергии Гиббса  $\Delta G_{\text{vib}}$  высокочастотных (вибрации химических связей 1 рода,  $\Delta G_{\text{vib}}^I$ ) и низкочастотных (механические вибрации лиганда в комплексе 2 рода,  $\Delta G_{\text{vib}}^{II}$ ) составляющих:  $\Delta G_{\text{vib}} = \Delta G_{\text{vib}}^I + \Delta G_{\text{vib}}^{II}$ . Расчет  $\Delta G_{\text{vib}}^I$  производится на основании стандартных выражений в приближении квантово-механического гармонического осциллятора [23]:

$$S_{\text{vib}}^I = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^{3N-6} \left[ \frac{h\nu_i}{e^{h\nu_i/kT} - 1} - kT \ln(1 - e^{-h\nu_i/kT}) \right], \quad H_{\text{vib}}^I = \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{h\nu_i}{e^{h\nu_i/kT} - 1} + \frac{h\nu_i}{2} \right), \quad (5)$$

$$\Delta S_{\text{vib}}^I = S_{\text{vib}}^{DN_2} - S_{\text{vib}}^D - S_{\text{vib}}^{N_2}, \quad \Delta H_{\text{vib}}^I = H_{\text{vib}}^{DN_2} - H_{\text{vib}}^D - H_{\text{vib}}^{N_2}, \quad \Delta G_{\text{vib}}^I = \Delta H_{\text{vib}}^I - T\Delta S_{\text{vib}}^I.$$

где  $\nu_i$  – нормальные частоты колебаний;  $N$  – число атомов в системе.

Расчет  $\Delta G_{\text{vib}}^{II}$  производится по формуле (6), являющейся пределом (5) при условии  $h\nu \ll kT$  с учетом вибраций вдоль каждой из трех координатных осей [15]:

$$\Delta H_{\text{vib}}^{II} = RT, \quad \Delta S_{\text{vib}}^{II} = R \ln \frac{kT}{h\nu} + R, \quad \Delta G_{\text{vib}}^{II} = \Delta H_{\text{vib}}^{II} - T\Delta S_{\text{vib}}^{II}. \quad (6)$$

Результаты расчета компонент конфигурационной энтропии по формулам (2)-(6) представлены в табл. 1,2.

### Анализ конформационной энтропии

Как следует из выражений (2), расчет составляющей  $\Delta G_{\text{conf}}$  требует знания общего числа стабильных ротамеров лиганда  $n$  и энергии внутримолекулярных взаимодействий  $E_j$  каждой стабильной  $j$ -й конформации ( $j \in 1..n$ ). В настоящей работе оценка  $n$  и  $E_j$  проводилась путем выделения в структуре лиганда единичных связей  $\ell$ , относительно которых возможно внутреннее вращение. Далее, путем искусственного вращения частей молекулы относительно выбранной связи с номером  $i$  в X-PLOR рассчитывался профиль потенциальной энергии  $U_i(\varphi)$ , по которому оценивалось число минимумов энергии, глубина каждого минимума, высота потенциального барьера  $\Delta U_i$  при переходе  $i$ -й

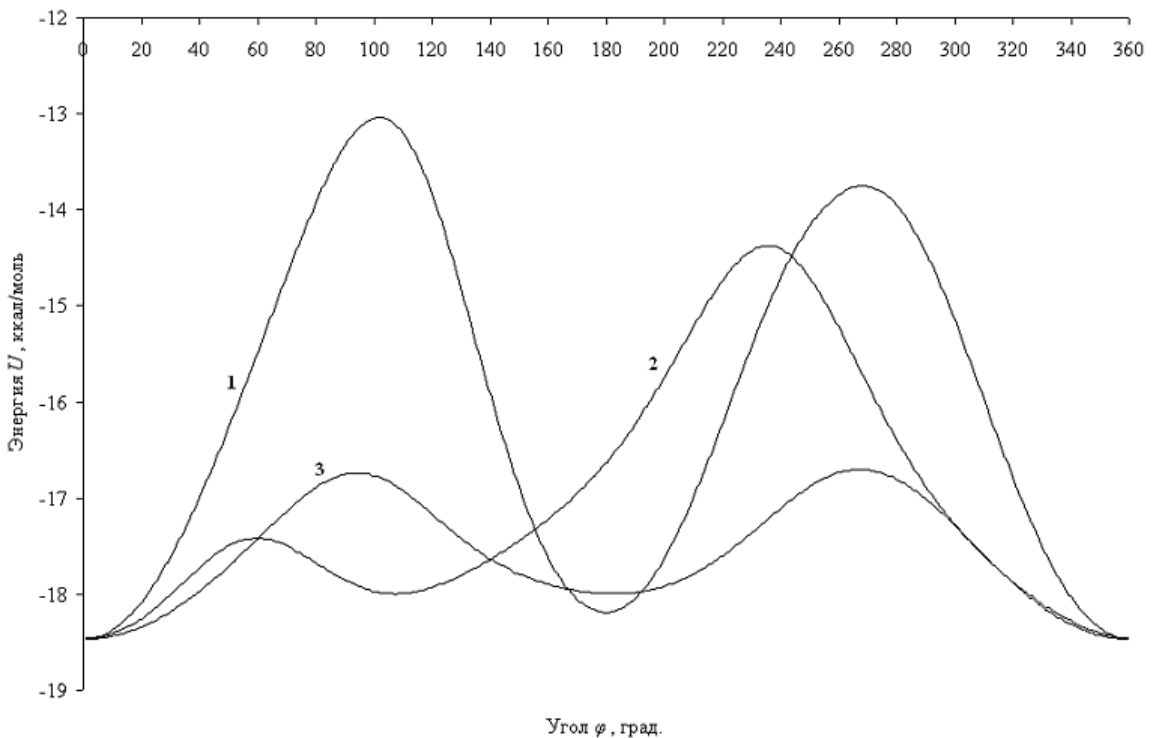


Рис. 2. Зависимость энергии внутримолекулярных взаимодействий от величин торсионных углов между циклами молекулы Хоекст 33258

связи из одной конформации в другую (в качестве примера на рис. 2 приведен типичный профиль  $U_i(\varphi)$  для трех единичных связей лиганда Хоекст33258; угол  $\varphi$  отсчитывался относительно исходной минимизированной структуры лиганда). Анализ показывает, что значения энергий минимумов при вращении связей отличаются друг от друга незначительно (в большинстве случаев одинаковы), следовательно, ротамеры MGB-лигандов можно условно считать изоэнергетичными. Это означает, что выражение (2) упрощается к виду  $\Delta G_{conf} = RT \ln n$  (см. табл. 2).

Таблица 2. Расчетные значения компонент конфигурационной энтропии при комплексобразовании MGB с ДНК (ккал/моль)

MGB	Трансляционные и Ротационные						Вибрационные 1 рода			Вибрационные 2 рода			$\Delta G_{conf}$	$\Delta G_{config}$
	$\Delta G_{tr}$	$\Delta H_{tr}$	$-T\Delta S_{tr}$	$\Delta G_{rot}$	$\Delta H_{rot}$	$-T\Delta S_{rot}$	$\Delta G_{vib}^I$	$\Delta H_{vib}^I$	$-T\Delta S_{vib}^I$	$\Delta G_{vib}^{II}$	$\Delta H_{vib}^{II}$	$-T\Delta S_{vib}^{II}$		
Беренил	9.9	-0.9	10.8	9.6	-0.9	10.5	4.0	6.3	-2.4	-8.5	1.78	-10.3	0.8	15.9
DAPI	9.9		10.8	9.4		10.3	11.5	9.6	1.9	-7.8		-9.5	1.3	24.3
DB293	10.1		11.0	10.0		10.9	5.5	7.1	-1.6	-7.9		-9.7	1.3	18.9
Дистамицин	10.4		11.3	10.9		11.8	19.4	14.7	4.7	-7.9		-9.6	1.7	34.5
Фураминдин (DB75)	10.0		10.9	9.7		10.6	5.1	7.3	-2.2	-7.9		-9.7	0.8	17.8
Хоекст 33258	10.3		11.2	10.5		11.3	10.7	15.5	-4.7	-7.8		-9.6	1.3	24.9
Негропсин	10.3		11.2	10.5		11.4	9.3	12.0	-2.7	-8.1		-9.9	1.3	23.2
Пентаминдин	10.1		11.0	10.2		11.1	16.9	13.1	3.8	-7.7		-9.5	0.8	30.2
Пропамидин	10.0		10.9	9.8		10.7	13.9	7.5	6.4	-7.8		-9.6	0.8	26.7
SN6999	10.3		11.2	10.5		11.4	5.4	8.1	-2.7	-7.9		-9.6	1.2	19.6

Из табл. 2 следует, что по всем рассматриваемым лигандам полная энергия  $\Delta G_{conf}$  не превышает 2 ккал/моль и значительно меньше экспериментальной энергии их связывания с ДНК ( $|\Delta G_{exp}|=6...10$  ккал/моль [7]). Этот вывод согласуется с аналогичными расчетами других авторов по соединениям, близким по структуре и молекулярной массе [22,30], и позволяет утверждать, что для класса рассматриваемых MGB-лигандов вклад конформационной энтропии несущественен.

Альтернативный выражениям (2) способ оценки  $\Delta G_{conf}$  основывается на эмпирическом допущении о том, что величина  $\Delta G_{conf}$  может быть рассчитана через известное число одинарных связей  $\ell$  в молекуле, относительно которых возможно внутреннее вращение:

$$\Delta G_{conf} \approx a \cdot \ell, \quad (7)$$

где  $a$  – эмпирический коэффициент, лежащий в диапазоне 0.4...1 ккал/моль на одну связь [17,30].

В контексте настоящей работы обоснованием (7) могут служить два основных допущения: 1) каждая связь имеет два эквивалентных минимума энергии внутреннего вращения, 2) ротамеры, образованные за счет внутреннего вращения относительно одинарных связей, являются различимыми. Следовательно, максимальное число ротамеров  $n=2^\ell$ , и на одну связь приходится энергия  $\Delta G_{conf}^1=R \cdot T \cdot \ln 2=0.4$  ккал/моль. Из таблицы 1 следует, что для 3-4 связей MGB-лигандов произведение  $a \cdot \ell$  хорошо согласуется с  $\Delta G_{conf}$ , полученное на основании выражений (2), давая несколько завышенные значения вследствие учета зеркально симметричных ротамеров.

Следует отметить, что оценочные значения  $\Delta G_{conf}$ , полученные в настоящей работе, фактически соответствуют ситуации, при которой внутреннее вращение лиганда пол-

ностью «замораживается» при комплексообразовании с ДНК. Как указывалось выше, это не соответствует действительности, т.е. расчетные значения  $\Delta G_{\text{conf}}$  в таблице 2 являются завышенными. Тем не менее, малость  $\Delta G_{\text{conf}}$  в сравнении с  $\Delta G_{\text{exp}}$  означает, что приближение «замораживания» внутреннего вращения практически не влияет на общую оценку конфигурационной энтропии для класса ДНК-связывающихся MGB-лигандов. Другим источником погрешности  $\Delta G_{\text{conf}}$  в данной работе является приближенный способ оценки числа ротамеров. Увеличение числа ротамеров, приведенного в таблице 1, даже в два раза равносильно введению одной связи, т.е. добавлению слагаемого  $R \cdot T \cdot \ln 2 = 0.4$  ккал/моль к  $\Delta G_{\text{conf}}$ , что, очевидно, не изменяет сделанный выше вывод о малости вклада конформационной энергии. Следует, однако, иметь в виду, что массивные лиганды с разветвленными боковыми цепями и множеством внутренних вращений могут характеризоваться значительным вкладом  $\Delta G_{\text{conf}}$  в конфигурационную энтропию комплексообразования с биорецептором.

### Анализ изменения числа степеней свободы

Из таблицы 2 следует, что энергетический эквивалент потери трансляционных и ротационных степеней свободы  $\Delta G_{\text{tr}}$ ,  $\Delta G_{\text{rot}}$  при связывании с ДНК является энергетически невыгодным процессом. Расчетные значения этих компонент мало зависят от вида лиганда и их сумма в среднем равна  $\langle \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{rot}} \rangle = 20.3$  ккал/моль. Полученное значение хорошо согласуется с тем, что получено ранее другими авторами для некоторых представителей группы MGB-лигандов [7,20], а также ароматических интеркаляторов ДНК [15].

Изменение вибраций химических связей (вибрации 1 рода  $\Delta G_{\text{vib}}^I$ ) при комплексообразовании с ДНК в целом энергетически невыгодно, что обусловлено доминированием энтальпийной составляющей  $\Delta H_{\text{vib}}^I > 0$  и эндотермическим характером образования новых мод колебаний (см. табл. 2). Интересно отметить, что связывание ароматических интеркаляторов с ДНК сопровождается, наоборот, однозначно выгодным вкладом вибраций 1 рода  $\Delta G_{\text{vib}}^I < 0$  и доминированием энтропийной составляющей  $T\Delta S_{\text{vib}}^I > 0$  [15,28]. Полученный результат не является неожиданным, поскольку ранее неоднократно отмечалось, что комплексообразование нежестких лигандов (типа белок-белок, белок-ДНК) может приводить к любому знаку  $\Delta G_{\text{vib}}^I$  (см., например, работу [31] и ссылки в ней).

Анализ расчетных значений изменения энергии Гиббса низкочастотных вибраций 2 рода  $\Delta G_{\text{vib}}^{II}$  (см. табл. 2) свидетельствует об энергетической выгоде процесса образования трех новых механических колебательных степеней свободы, имеющего преимущественно энтропийную природу. Аналогичный вывод был сделан ранее для класса ДНК-связывающихся ароматических лигандов [15].

В целом составляющие  $\Delta G_{\text{vib}}^I$  и  $\Delta G_{\text{vib}}^{II}$  оказываются соизмеримыми с  $\Delta G_{\text{tr}}$  и  $\Delta G_{\text{rot}}$  по абсолютной величине, однако имеют противоположные знаки и в основном компенсируют друг друга (за исключением дистамицина). Таким образом, основной вклад в изменение конфигурационной энтропии связывания с ДНК лигандов группы MGB дает потеря трансляционных и ротационных степеней свободы.

Представляет особый интерес анализ низкочастотных крутильных колебаний атомных групп и колец в молекулах MGB, поскольку этот вид внутреннего вращения может претерпевать существенные изменения за счет частичного «замораживания» в комплексе с биорецептором. Отметим, что низкочастотные крутильные колебания связей  $\nu_i$  автоматически учитываются в расчете  $\Delta G_{\text{vib}}^I$  в системе Gaussian, однако их выделение из структуры вибрационной энергии 1 рода представляет собой достаточно слож-



ную задачу [32], в связи с чем оценка энергетике этих колебаний  $\Delta G_i$  в настоящей работе производилась отдельно. По своей сути методика расчета  $\nu_i$  и  $\Delta G_i$  подобна использованной выше для расчета механических вибраций  $\Delta G_{vib}^H$ .

Энергия Гиббса крутильных колебаний вокруг  $i$ -й связи,  $\Delta G_i$ , рассчитывалась из соотношений, аналогичных (5), при условии  $i=1$  (одна крутильная мода). Соответствующие частоты крутильных колебаний  $\nu_i$  вычислялись как

$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_i}{I_{ri}}}, \text{ Гц} \quad (8)$$

где  $I_{ri} = \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$  - приведенный момент инерции двух частей молекулы относительно данной связи с моментами инерции относительно нее  $I_1$  и  $I_2$ , соответственно;  $K_i$  - константа жесткости кручения.

Значение  $K_i$  вычислялось путем аппроксимации зависимостей потенциальной энергии  $U$  внутримолекулярных взаимодействий (электростатических и ван-дер-ваальсовых) в MGB-лигандах от угла поворота  $\varphi$  вокруг данной связи (см. рис. 2) вблизи положения минимума энергии выражением

$$U = \frac{K_i \varphi^2}{2}. \quad (9)$$

Из табл. 1 следует, что диапазон расчетных энергий  $\Delta G_i$  кручения на одну связь в среднем согласуется со значением  $\Delta G_{conf}^1$ , описывающем конформационную энергию одной связи. При комплексообразовании с ДНК  $\Delta G_{conf}^1 > 0$  вследствие энтропийной невыгодности конформационного ограничения лиганда в сайте, в то же время  $\Delta G_i < 0$  из-за энтальпийной выгоды потери вращательной свободы. В результате на молекулу в целом имеем примерную компенсацию энергетике низкочастотных крутильных колебаний и конформационной энергии  $\Delta G_{conf}$ , обусловленной этими же крутильными колебаниями. Данный вывод является новым и, по-видимому, отражает общепризнанный в молекулярной биофизике эффект энтальпийно-энтропийной компенсации.

### Учет эффектов ангармоничности при расчете вибрационной энергии

Необходимо отметить, что расчет вибраций химических связей, проведенный в настоящей работе эмпирическим методом Dreiding, имеет ряд преимуществ перед методами молекулярной динамики (см. выше): учет изменения спектра вибраций как лиганда, так и ДНК, малые затраты машинного времени и др. В то же время, такой подход имеет принципиальный недостаток. Стандартные эмпирические и полуэмпирические подходы, широко используемые в настоящее время многими исследователями и доступные во многих специализированных программных вычислительных комплексах типа Gaussian, относятся к группе методов анализа нормальных колебательных мод, основанных на приближении гармонического характера колебаний элементарных осцилляторов. Это равносильно оперированию малыми энергиями колебаний в сравнении с высотами потенциальных барьеров  $\Delta U$ , разделяющих стабильные конформации при внутреннем вращении, т.е., в конечном счете, пренебрежение эффектами ангармоничности. Многие авторы считают, что эффекты ангармоничности, присутствующие как в свободном, так и связанном состоянии лиганда, вычитаются при расчете изменения вибрационной энергии, поэтому анализ нормальных мод является вполне допустимым для исследования любых систем (см., например, работы [21,31]). Однако этот подход может считаться вполне оправданным лишь для высокочастотной части  $\Delta G_{vib}^I$ , ответственной именно за колебания химических связей, в то время как низкочастотная часть

$\Delta G_{vib}^I$ , включающая в себя малые крутильные колебания единичных связей ( $\nu_i$  в Таблице 1) и практически не допускающая своего выделения из структуры  $\Delta G_{vib}^I$ , не обязательно должна следовать такому приближению [32]. Например, внутреннее вращение лиганда в свободном состоянии может носить характер ангармонического «свободного» или «заторможенного» волчка, а в комплексе с биорецептором приобретать характер гармонического осциллятора.

Детальный анализ эффектов ангармоничности внутреннего вращения показал [32], что при условии  $\Delta U > RT$  максимальная погрешность использования модели гармонического осциллятора составляет 10-15%. Из таблицы 1 следует, что  $\Delta U$  для всех MGB-лигандов превышает тепловую энергию при  $T=300\text{K}$  ( $RT=0.6$  ккал/моль), что служит основанием считать несущественным вклад ангармоничности в расчет конфигурационной энтропии, проведенный в настоящей работе. Независимая проверка этого заключения была нами проведена в системе Gaussian путем расчета  $\Delta G_{vib}^I$  в режиме коррекции на заторможенность внутреннего вращения (команда HINDROT). Из всех рассмотренных лигандов только на DAPI (наиболее простой по структуре лиганд) процедура расчета была успешно завершена. Результат расчета свидетельствовал о незначительном влиянии ангармоничности на величину вибрационной энергии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведен анализ изменения конфигурационной энтропии 10 типичных представителей группы лигандов, связывающихся в малую канавку ДНК. Использованная методика учитывает потерю трансляционных  $\Delta G_{tr}$  и ротационных  $\Delta G_{rot}$  степеней свободы, энергетический эквивалент изменения высокочастотных  $\Delta G_{vib}^I$  и низкочастотных  $\Delta G_{vib}^{II}$  вибраций лиганда и ДНК при комплексообразовании, а также конформационные изменения лиганда  $\Delta G_{conf}$ . Показано, что составляющая  $\Delta G_{conf}$  во всех случаях дает сравнительно малый вклад в конфигурационную энтропию и при проведении полного энергетического анализа связывания MGB-лигандов с ДНК может не приниматься во внимание. Более того, установлено, что на каждую одинарную связь, относительно которой возможно внутреннее вращение с образованием ротамеров MGB, имеет место примерная компенсация энергетики низкочастотных крутильных колебаний относительно этих связей и конформационной энергии  $\Delta G_{conf}$ , обусловленной этими же крутильными колебаниями.

Установлено, что высокочастотные вибрации  $\Delta G_{vib}^I$  энергетически невыгодны и носят преимущественно энтальпийный характер, в то время как остаточные механические вибрации лиганда в комплексе  $\Delta G_{vib}^{II}$  энергетически выгодны и преимущественно энтропийны. Это приводит к взаимной компенсации вибрационных вкладов и доминированию потери трансляционных и ротационных степеней свободы в структуре суммарной конфигурационной энтропии связывания MGB-лигандов с ДНК.

Полученные значения конфигурационной энтропии далее могут быть использованы в решении общей задачи декомпозиции экспериментальной энергии Гиббса связывания MGB с ДНК на составляющие, ответственные за вклад различных физических взаимодействий в процесс комплексообразования, с целью выделения стабилизирующих/дестабилизирующих комплексы Лиганд-ДНК факторов. Предварительные результаты свидетельствуют о том, что использованный метод расчета конфигурационной энтропии позволяет данную задачу решить.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта Президента Украины Ф27/60-2010.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson S.M., Ferguson L.R., Denny W.A. Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents // *Mutat. Res.* – 2007. – V.623. – P.24–40.
2. Suckling C.J. Molecular recognition and physico-chemical properties in the discovery of selective antibacterial minor groove binders // *J. Phys. Org. Chem.* – 2008. – V.21. – P. 575–583.
3. Wang L., Bailly C., Kumar A., Ding D., Bajic M., Boykin D.W., Wilson W.D. Specific molecular recognition of mixed nucleic acid sequences: an aromatic dication that binds in the DNA minor groove as a dimer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2000. – V.97. – P. 12–16.
4. Anthony N.G., Fox K.R., Johnston B.F., Khalaf A.I., Mackay S.P., McGroarty I.S., Parkinson J.A., Skellern G.G., Suckling C.J., Waigh R.D. DNA binding of short lexitropsins // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2004. – V.14. – P. 1353–1356.
5. Tanious F.A., Hamelberg D., Baily C., Czarny A., Boykin D.W., Wilson W.D. DNA sequence dependent monomer-dimer binding modulation of asymmetric benzimidazole derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V.126. – P. 143–153.
6. Haq I. Thermodynamics of drug-DNA interactions // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – V.403. – P.1–15.
7. Shaikh S.A., Ahmed S.R., Jayaram B. A molecular thermodynamic view of DNA-drug interactions: a case study of 25 minor-groove binders // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – V.429. – P. 81–99.
8. Treesuwan W., Wittayanarakul K., Anthony N.G., Huchet G., Alniss H., Hannongbua S., Khalaf A.I., Suckling C.J., Parkinson J.A., Mackay S.P. A detailed binding free energy study of 2:1 ligand-DNA complex formation by experiment and simulation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2009. – V.11. – P. 10682–10693.
9. Zhou H.-X., Gilson M.K. Theory of free energy and entropy in noncovalent binding // *Chem. Rev.* – 2009. – V.109. – P. 4092–4107.
10. Harris S.A., Gavathiotis E., Searle M.S., Orozco M., Laughton C.A. Cooperativity in Drug-DNA recognition: a molecular dynamics study // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V.123. – P. 12658–12663.
11. 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. – V. 28. – P. 235–242.
12. Brunger A.T. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR. – Yale: Univ. Press, 1992. – 382 p.
13. 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.
14. Gaussian, Inc., 2004. Gaussian 03. Gaussian, Wallingford, CT.
15. Kostyukov V.V., Homutova N.M., Evstigneev M.P. Vklad izmeneniya translyatsionnyh, rotatsionnyh i vibratsionnyh stepeney svobody v energiyu kompleksobrazovaniya aromaticheskikh ligandov s DNK // *Biofizika.* – 2009. – V. 54. – P. 606–615.
16. Carlsson J., Aquist J. Calculations of solute and solvent entropies from molecular dynamics simulations // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2006. – V.8. – P. 5385–5395.
17. DuBay K.H., Geissler P. Calculation of proteins' total side-chain torsional entropy and its influence on protein-ligand interactions // *J. Mol. Biol.* – 2009. – V.391. – P. 484–497.
18. Dolenc J., Baron R., Oostenbrink C., Koller J., van Gunsteren W.F. Configurational entropy change of neopterin and distamycin upon DNA minor-groove binding // *Biophys. J.* – 2006. – V.91. – P. 1460–1470.
19. Wang H., Laughton C.A. Molecular modelling methods for prediction of sequence-selectivity in DNA recognition // *Methods.* – 2007. – V.42. – P.196–203.
20. Spackova N., Cheatham III T.E., Ryjacek F., Lankas F., van Meervelt L., Hobza P., Sponer J. Molecular dynamics simulations and thermodynamics analysis of DNA-drug complexes. Minor groove binding between 4',6-diamidino-2-phenylindole and DNA duplexes in solution // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V.125. – P. 1759–1769.
21. Tidor B., Karplus M. The contribution of vibrational entropy to molecular association // *J. Mol. Biol.* – 1994. – V.238. – P. 405–414.
22. Chang C.A., Chen W., Gilson M.K. Ligand configurational entropy and protein binding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V.104. – P.1534–1539.
23. Yu Y.B., Privalov P.L., Hodges R.S. Contribution of translational and rotational motions to molecular associations in aqueous solution // *Biophys. J.* – 2001. – V.81. – P. 1632–1642.
24. Gilson M.K., Given J.A., Bush B.L., McCammon J.A. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review // *Biophys. J.* – 1997. – V.72. – P. 1047–1069.
25. 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. – V.274. – P. 253–267.
26. Finkelstein A.V., Janin J. The price of lost freedom: entropy of bimolecular complex formation // *Protein Eng.* – 1989. – V.3. – P. 1–3.

27. Searle M.S., Williams D.H., Gerhard U. Partitioning of free energy contributions in the estimation of binding constants: residual motions and consequences for amide–amide hydrogen bond strengths // *J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – V.114. – P. 10697–10704.
28. Kostjukov V.V., Khomytova N.M., Evstigneev M.P. Partition of thermodynamic energies of drug–DNA complexation // *Biopolymers.* – 2009. – V.91. – P. 773–790.
29. Kostjukov V.V., Tverdohlib N.M., Evstigneev M.P. Energetichnyy analiz kompleksoutvorenniya aromatichnih molekul u vodnomu rozchini // *Ukr. fizichn. zhurn.* – 2011. – V.56. – P. 38-49.
30. Gilson M.K., Zhou H.-X. Calculation of protein–ligand binding affinities // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2007. – V.36. – P. 21–42.
31. Noskov S.Yu., Lim C. Free energy decomposition of protein–protein interactions // *Biophys. J.* – 2001. – V.81. – P. 737–750.
32. Ayala P.Y., Schlegel H.B. Identification and treatment of internal rotation in normal mode vibrational analysis // *J. Chem. Phys.* – 1998. – V.108. – P. 2314–2325.