

УДК 577.113:577.32

В.В. Костюков, канд. физ.-мат. наук, ст. преп.

Н.М. Хомутова, студент

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: Viktor_Kostukov@mail.ru

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ С ДНК

Проведено вычисление энергетических составляющих от различных физических факторов в полную энергию Гиббса комплексообразования двуспиральной ДНК с ароматическими мутагенами бромистым этидием и профлавином. Обнаружено, что малая величина полной энергии связывания представляет собой сумму больших по абсолютному значению и противоположных по знаку компонентов. Расчеты показали, что полиэлектролитный и гидрофобный вклады благоприятствуют комплексообразованию данных мутагенов с ДНК, а ван-дер-ваальсова и энтропийная компоненты, а также водородные связи оказываются энергетически невыгодными. Электростатический вклад при комплексообразовании ДНК с профлавином является выгодным, а для связывания с бромистым этидием он неблагоприятен.

Ключевые слова: ароматический мутаген, энергетический вклад, комплексообразование с ДНК, разложение по энергиям

Введение. Многие ароматические биологически активные соединения (БАС) в настоящее время широко используются в клинической практике [1]. Механизм действия ароматических БАС в большинстве случаев обусловлен прямым действием на ДНК в ядре клетки путем интеркаляционного связывания и последующим блокированием жизненно важных клеточных процессов. Поэтому детальное изучение комплексообразования ароматических веществ с ДНК является важной задачей для понимания эффекта действия существующих препаратов и создания новых, более эффективных лекарственных средств.

Информация об энергетическом вкладе различных видов физических взаимодействий в суммарную энергию Гиббса реакции комплексообразования является неотъемлемой составляющей полной картины связывания лиганда с ДНК. В настоящее время для разделения общей энергии Гиббса комплексообразования с ДНК ароматического лиганда на вклады от различных физических факторов используется методика [2], которая основывается на уравнении

$$\Delta G_{\text{total}} = \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{r+t}} + \Delta G_{\text{pe}} + \Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{mol}}, \quad (1)$$

где ΔG_{conf} – составляющая от конформационных изменений в ДНК и интеркаляторе; $\Delta G_{\text{r+t}}$ – вклад изменения ротационных и трансляционных степеней свободы при комплексообразовании; ΔG_{pe} – полиэлектролитный вклад; ΔG_{hyd} – гидрофобный вклад; ΔG_{mol} – вклад других видов молекулярных взаимодействий.

Основным недостатком подхода (1) является составляющая ΔG_{mol} , которая неявно учитывает вклад от ван-дер-ваальсовых, электростатических взаимодействий и водородных связей. В работе [3] было показано, что ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия имеют важное значение для стабилизации комплексов ДНК-Лиганд. Поэтому методика, основанная на уравнении (1), представляется неполной и нуждается в детальном разделении ΔG_{mol} на соответствующие вклады.

В данной работе проведено разделение полной энергии Гиббса связывания с ДНК ароматических мутагенов (рисунок 1) бромистого этидия (ЕВ) и профлавина (PF) на энергетические вклады, которые явно учитывают вклады от водородных связей, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

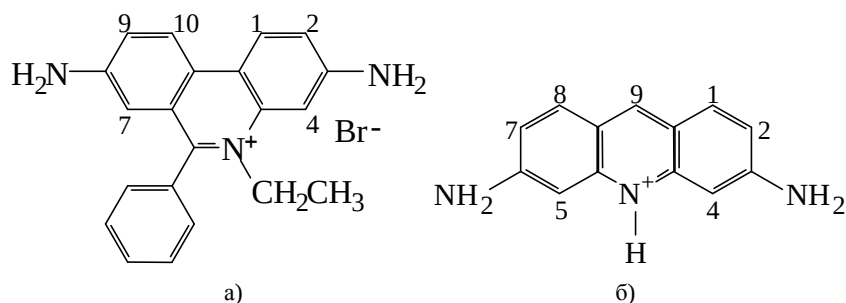


Рисунок 1 - Структурные формулы мутагенов бромистого этидия (а) и профлавина (б)

Методи. Пространственные структуры лигандов EB и PF (см. рисунок 1) взяты из Protein Data Bank (PDB коды Ids 1jty и 1qvt, соответственно). Атомные заряды EB и PF взяты из работ [3,4], соответственно. Топология молекул лигандов и параметризация всех валентных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий получены с помощью пакета XPLOR2D.

С учетом специфичности исследуемых мутагенов к 5'-CG последовательности [1], в качестве участка интеркаляции лигандов был выбран центральный CG-сайт самокомплементарного декамера ДНК d(GCGTCGACGC)₂. Пространственная структура двуспиральной В-ДНК построена с помощью программы HyperChem 8.0. Величины 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.

Пространственные структуры комплексов мутагенов с ДНК построены методом молекулярной механики с помощью программы X-PLOR, версия 3.1. Формирование CG сайта интеркаляции в центре декамера проводилось путем смещения половины его атомов вдоль оси z спирали на 3.4 Å и поворотом их на величины изменения углов спирального вращения ΔΩ, взятые из работы [5]. При этом молекула EB встраивалась в CrG сайт олигомера ДНК со стороны малой канавки, в которой размещалась ее фенольное кольцо, а PF – со стороны большой канавки, где были расположены ее аминокислотные группы.

Задание водного окружения производилось явно, с использованием молекул воды модели TIP3P, размещенных в кубическом боксе с длиной ребра 35 Å (1423 молекулы). Нейтрализация зарядов фосфатов ДНК выполнялась при помощи 18 ионов Na⁺, размещенных на расстояниях 6 Å от атомов фосфора на биссектрисах углов O1P-P-O2P.

Вычисление конформационной динамики лигандов, ДНК и их комплексов в процессе теплового движения выполнено при помощи пакета X-PLOR. Оптимизация геометрии комплексов мутаген-ДНК проводилась путем минимизации потенциальной энергии методом сопряженных градиентов. На первой стадии минимизации атомы растворенных веществ фиксировались для улучшения релаксации ближайших к ним молекул воды к равновесным положениям. Второй этап проводился без каких-либо ограничений на движение атомов.

После минимизации потенциальной энергии выполнялась процедура молекулярной динамики (МД) по алгоритму Verlet с временным шагом Δt = 2 фс (использовался алгоритм SHAKE) при постоянной температуре T = 298 К. В процессе моделирования МД внешняя водная оболочка фиксировалась для исключения вылета молекул воды в окружающий вакуум. Нефиксированный водный слой соответствовал толщине ближней гидратной оболочки – бимолекулярному слою в ≈ 4 Å. Полное время эволюции составило 2 нс. Координаты всех атомов сохранялись через каждую 1 пс.

Гидратационные индексы, т.е. средние количества молекул воды, формирующих водородные связи с электроотрицательными атомами (N, O) молекул ДНК и лигандов, рассчитывались по траекториям теплового движения в течение последних 40 пс молекулярной динамики. Наличие Н-связи фиксировалось в случае, если расстояния между гидрофильными атомами молекул и атомами кислорода (водорода) воды не превышали 3.2 (2.4) Å, соответственно.

Величины изменения энергии внутримолекулярных взаимодействий ΔG_{im}^{uw} в процессе раскручивания 10-мера при образовании интеркаляционной полости в вакууме рассчитывались методом возмущения свободной энергии (Free Energy Perturbation, FEP) [4] с помощью пакета MOIL. Заряды ДНК при этом обнулялись. Основной вклад в ΔG_{im}^{uw} вносят внутримолекулярные ван-дер-ваальсовы взаимодействия между парами оснований раскручиваемого сайта.

Метод FEP основан на представлении энергии Гиббса в ходе молекулярной динамики в виде суммы:

$$\Delta G_{im}^{uw} = G_u - G_n = -RT \sum_{\lambda=0}^1 \ln \left\langle \exp \left(- \frac{H(\lambda + \Delta\lambda) - H(\lambda)}{RT} \right) \right\rangle_{\lambda},$$

где G_u и G_n – энергии Гиббса раскрученной и нормальной спиралей ДНК, соответственно; H – гамильтониан системы; λ – параметр.

Промежуточные значения H рассчитывались согласно [4] как H(λ) = λH_u + (1 - λ)H_n, где H_u и H_n – гамильтонианы раскрученного и нормального декамеров ДНК, соответственно. Количество шагов (точек вычисления H между 0 и 1) принималось равным 30000, т.е. Δλ = 1/30000.

Расчет площади поверхности, доступной растворителю (solvent accessible surface area – SASA) в настоящей работе проводился при помощи программы GETAREA, версия 1.1. SASA представляет собой площадь геометрического места центра пробной сферы с радиусом, равным ван-дер-ваальсовому радиусу молекулы воды (1.4 Å) при ее движении по ван-дер-ваальсовой поверхности молекулы растворенного вещества или комплекса.

Результаты и обсуждение. Уравнение (1), как отмечалось выше, является неполным, т.к. не учитывает в явном виде все энергетические составляющие реакции комплексообразования ароматических лигандов с ДНК. Более подробная форма записи уравнения (1), явно учитывающая энергию ван-дер-ваальсовых ΔG_{vdw} , электростатических ΔG_{el} взаимодействий и водородных связей ΔG_{HB} , имеет вид:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{conf} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{el} + \Delta G_{pe} + \Delta G_{HB} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{entr} . \quad (2)$$

При этом компонента ΔG_{tr+rot} из (1), которая учитывает потерю трансляционных и ротационных степеней свободы, должна быть заменена более общей составляющей ΔG_{entr}

$$\Delta G_{entr} = \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vibr}, \quad (3)$$

включающую в себя также энергетический вклад ΔG_{vibr} изменения числа вибрационных степеней свободы при образования комплексов Лиганд-ДНК.

В общей методике энергетического анализа необходимо принимать во внимание тот факт, что интеркаляция лиганда в двуспиральную ДНК должна рассматриваться как процесс, состоящий из двух этапов [2]: локальное раскручивание ДНК с образованием интеркаляционной полости ΔG_{uw} , и вставление в нее лиганда ΔG_{ins} :

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{uw} + \Delta G_{ins}. \quad (4)$$

Именно конформационные изменения в ДНК при раскручивании, ΔG_{uw} , дают основной вклад в компонент ΔG_{conf} в уравнении (2), т.е. $\Delta G_{conf} \approx \Delta G_{uw}$ [2]. Двухстадийность процесса интеркаляции обуславливает необходимость вычисления каждого из энергетических вкладов в уравнении (2) отдельно для каждого этапа.

Необходимо учитывать также, что процесс комплексообразования лигандов с ДНК происходит в водной среде. При этом взаимодействие с водной средой не ограничивается лишь гидрофобной составляющей ΔG_{hyd} , а включает в себя также ван-дер-ваальсовы, электростатические взаимодействия и Н-связи с молекулами воды [6]. Поэтому полный энергетический анализ связывания лиганда с ДНК должен включать в себя разделение суммарной энергии реакции комплексообразования на внутри- и межмолекулярные взаимодействия ДНК и лиганда ΔG_{im} , и их взаимодействие с растворителем ΔG_{solv} :

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{im} + \Delta G_{solv}. \quad (5)$$

Уравнения (2)-(5) являются методологической основой решаемой задачи – вычисления вкладов различных физических факторов в полную энергию Гиббса реакций комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК.

Величины ван-дер-ваальсовых энергий (VDW) в комплексах Лиганд-ДНК, усредненные в ходе молекулярной динамики, вычислялись при помощи программы X-PLOR. Для учета энтропийного вклада в раскручивание ДНК VDW энергия процесса раскручивания ΔG_{im}^{uw} рассчитывалась методом FEP (см. Методы и таблицу 1).

Таблица 1 - Расчетные величины энергий ван-дер-ваальсовых взаимодействий (ккал/моль) при связывании мутагенов с 10-мером ДНК

Лиганд	Раскручивание			Вставление			Интеркаляция		
	ΔG_{im}^{uw}	ΔG_{solv}^{uw}	ΔG_{vdw}^{uw}	ΔG_{im}^{ins}	ΔG_{solv}^{ins}	ΔG_{vdw}^{ins}	ΔG_{im}^{bind}	ΔG_{solv}^{bind}	ΔG_{vdw}^{bind}
EB	26.9	-15.5	11.4	-52.1	41.1	-11.0	-25.2	25.6	0.4
PF	30.2	-30.8	-0.6	-41.7	43.1	1.4	-11.5	12.3	0.8

Как и ожидалось, энергия внутримолекулярных взаимодействий пар оснований ДНК ΔG_{im}^{uw} при раскручивании оказывается больше нуля. Это обусловлено пространственным удалением пар оснований при образовании между ними интеркаляционной полости. Энергия VDW взаимодействий с водной средой при раскручивании ΔG_{solv}^{uw} является отрицательной, что вызвано гидратацией интеркаляционной полости при образовании сайта интеркаляции.

На этапе вставления молекул мутагенов в интеркаляционную полость ДНК межмолекулярная энергия взаимодействия лиганда и ДНК ΔG_{im}^{ins} отрицательна, т.к. ван-дер-ваальсовы взаимодействия при этом являются силами притяжения. В то же время, VDW энергия взаимодействия комплекса с растворителем ΔG_{solv}^{ins} положительна за счет дегидратации мутагена при его вставлении в ДНК. Полная VDW энергия процесса вставления ΔG_{vdw}^{ins} является сравнительно малой величиной и представлена суммой двух больших чисел с противоположными знаками: энергетически выгодным внутримолекулярным взаимодействием ДНК и мутагена и невыгодным взаимодействием с

растворителем. Такая компенсация приводит как к положительному (PF), так и отрицательному (EB) энергетическому вкладу VDW взаимодействий ΔG_{vdw}^{ins} в стабилизацию комплекса. Поэтому VDW взаимодействия на этапе вставления лиганда могут, в принципе, как способствовать, так и препятствовать процессу комплексообразования.

Полная VDW энергия всего процесса интеркаляции (раскручивание + вставление) ΔG_{vdw}^{bind} , как и в случае рассмотренного выше этапа вставления, является суммой двух больших чисел $\Delta G_{im}^{bind} + \Delta G_{solv}^{bind}$, при сложении дающих сравнительно малый энергетический эффект. Это, однако, не означает, что энергетика VDW взаимодействий может не учитываться в энергетическом анализе реакций комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК. Как указывалось выше, стабилизация комплексов происходит в основном именно на этапе вставления лиганда. При этом этап раскручивания не дает непосредственного вклада в стабилизацию лиганда в интеркаляционной полости.

Анализ энергетического вклада электростатических взаимодействий был подробно проведен нами в работе [7] методом решения нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана. Этот подход позволяет учесть изменение электрических свойств ближайшего гидратного слоя макромолекулы при связывании лиганда. В данной работе приводятся лишь основные результаты расчетов и анализа для данного 10-мера и двух исследуемых мутагенов. В дальнейшем они будут использованы в полном энергетическом анализе.

Согласно расчетам (см. таблицу 2), электростатические взаимодействия на этапе вставления лиганда ΔG_{el}^{ins} дестабилизируют комплекс мутаген-ДНК в водной среде. При этом полная электростатическая энергия комплексообразования ΔG_{el}^{bind} может оказаться как благоприятной (PF), так и неблагоприятной (EB). Как и в случае ван-дер-ваальсовых сил, рассмотренных выше, результирующий электростатический вклад определяется суммой двух больших чисел, имеющих противоположные знаки: взаимодействия комплекса с растворителем ΔG_{solv}^{bind} и кулоновских взаимодействий атомных зарядов лиганда и ДНК ΔG_{im}^{bind} . Более того, в работе [7] был сделан вывод о том, что только отдельное рассмотрение этапов раскручивания и вставления лиганда, а также внутри- и межмолекулярных взаимодействий и взаимодействий с водной средой позволяет правильно интерпретировать электростатический вклад в энергию комплексообразования интеркаляторов с ДНК. Как видно, качественные закономерности электростатических взаимодействий оказываются в целом подобными рассмотренным выше ван-дер-ваальсовым взаимодействиям.

Таблица 2 - Расчетные значения энергий электростатических взаимодействий (ккал/моль) при связывании антибиотиков с 10-мером ДНК [7]

Лиганд	Раскручивание			Вставление			Интеркаляция		
	ΔG_{im}^{uw}	ΔG_{solv}^{uw}	ΔG_{el}^{uw}	ΔG_{im}^{ins}	ΔG_{solv}^{ins}	ΔG_{el}^{ins}	ΔG_{im}^{bind}	ΔG_{solv}^{bind}	ΔG_{el}^{bind}
EB	-29.1	26.4	-2.7	-144.5	149.9	5.4	-173.5	176.3	2.8
PF	-27.1	24.4	-2.7	-125.3	127.3	2.0	-152.4	151.7	-0.7

Полиэлектролитный вклад ΔG_{pe} в полную энергию комплексообразования включает в себя энтальпийный компонент, обусловленный кулоновским взаимодействием исследуемых молекул с ионами соли, и энтропийную составляющую, вызванную нарушением ионной атмосферы при интеркаляции мутагена. Компонент ΔG_{pe} представляется рациональным отделить от полной электростатической энергии ΔG_{el} , поскольку он может быть сравнительно просто измерен экспериментально, и для EB он равен $\Delta G_{pe} = -1.2$ ккал/моль [2]. К сожалению, для мутагена PF величина ΔG_{pe} в литературе отсутствует. В то же время, результаты работы [2] свидетельствуют о том, что полиэлектролитный вклад для трехколечных ароматических лигандов мало зависит от типа молекулы и в среднем равен $\Delta G_{pe} = -1.1$ ккал/моль. Поэтому указанное значение было использовано нами при оценке ΔG_{pe} для молекулы PF. Как видно, полиэлектролитный вклад значительно меньше экспериментальной энергии связывания (см. таблицу 6) и способствует образованию комплекса. Эффект по своей природе носит преимущественно энтропийный характер и обусловлен энтропийно выгодным высвобождением противоионов при интеркаляции лиганда в ДНК [2].

Водородные связи при комплексообразовании ароматических мутагенов с ДНК можно разделить по их происхождению на две группы:

- 1) формирование межмолекулярных Н-связей между лигандом и ДНК в пределах интеркаляционной полости, и
- 2) потеря водородных связей с молекулами воды в процессе дегидратации лиганда и ДНК при вставлении в сайт интеркаляции.

Число водородных связей первого типа, N_{im} , может быть определено из расчетной структуры комплекса и поставлено в соответствие с литературными данными. Средняя энергия межмолекулярной Н-связи составляет около -9 ккал/моль [6]. Поэтому в данной работе энергетический вклад межмолекулярных Н-связей, который является энтальпийным по своей природе, оценивался по формуле $\Delta G_{im} = \Delta H_{im} = -N_{im} \cdot 9$ ккал/моль (таблица 3).

Вклад энергии водородного связывания с водой, обусловленный дегидратацией мутагена и интеркаляционной полости ДНК при комплексообразовании, может быть оценен по изменению среднего числа молекул воды, формирующих Н-связи с электротрицательными атомами растворенной молекулы, т.е. ее гидратационного индекса ΔN_{solv} , в процессе МД. При этом средняя величина энтальпии Н-связи с водой практически совпадает с энергией межмолекулярной связи -9 ккал/моль [6], а энтропийная составляющая Н-связи с водой учитывается в гидрофобном вкладе ΔG_{hyd} (см. ниже). Необходимо также учитывать, что используемое в настоящей работе для расчета ван-дер-ваальсового вклада силовое поле AMBER и методика расчета электростатического вклада отчасти уже учитывают энергетику Н-связи. Согласно нашим оценкам, при вычислении VDW и электростатических взаимодействий недооцениваются приблизительно 25 % энергии Н-связей. Поэтому энергетический вклад Н-связей $\Delta \Delta G_{HB}$, который, по существу, является добавкой к (2) для корректировки полной энергии на водородное связывание, будет иметь вид:

$$\Delta \Delta G_{HB} = -0.25 \cdot 9 \cdot (N_{im} + \Delta N_{solv}), \text{ ккал/моль}$$

Таблица 3 - Энергетический вклад водородных связей (ккал/моль)

Лиганд	Раскручивание		Вставление			Интеркаляция	
	ΔN_{solv}	$\Delta \Delta G_{HB}$	N_{im}	ΔN_{solv}	$\Delta \Delta G_{HB}$	ΔN_{solv}	$\Delta \Delta G_{HB}$
EB	3.1	-7.1	1	-5.9	11.3	-2.8	4.1
PF	3.0	-6.9	1	-6.3	12.2	-3.3	5.3

Вычисление гидрофобного вклада ΔG_{hyd} в энергию комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК в настоящей работе проведено на основании известной корреляции энергии гидрофобного растворения ΔG_{hyd} с изменением площади поверхности, доступной для растворителя ΔA [8] (таблица 4):

$$\Delta G_{hyd} = \gamma \Delta A,$$

где γ – микроскопический коэффициент поверхностного натяжения, $\gamma = 50$ кал/(моль·Å²).

Таблица 4 - Площади поверхностей молекул и их комплексов (Å²) и соответствующий гидрофобный вклад ΔG_{hyd} (ккал/моль)

Лиганд	$A(L)$	$A(ДНК)$	Раскручивание			Вставление			Связывание
			$A(ДНК^*)$	ΔA	ΔG_{hyd}^{uw}	$A(K)$	ΔA	ΔG_{hyd}^{ins}	
EB	572	4063	4277	214	10.7	4160	-689	-34.5	-23.8
PF	419	4063	4278	215	10.7	4163	-534	-26.7	-16.0

Примечание: 'L' - лиганд, 'K' – комплекс

Из таблицы 4 видно, что гидрофобный вклад в целом способствует комплексообразованию и существенно превышает суммарную энергию связывания антибиотиков с ДНК (см. таблицу 6).

Энтропийная составляющая ΔG_{entr} энергии комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК вызвана изменением числа трансляционных, ротационных и вибрационных степеней свободы (см. уравнение (3)). Вклады ΔG_{tr} и ΔG_{rot} возникают из-за потери трех трансляционных и трех ротационных движений при образовании комплекса. Составляющая ΔG_{vibr} , согласно [9], является энергетическим эквивалентом изменения вибрации химических связей и образования новой колебательной степени свободы, обусловленной механическими колебаниями молекулы мутагена в сайте интеркаляции:

$$\Delta G_{vibr} = \Delta G_{vibr}^I + \Delta G_{vibr}^{II},$$

где $\Delta G_{vibr}^I, \Delta G_{vibr}^{II}$ – изменения вибраций химических связей (вибрации I рода) и механических колебаний (вибрации II рода), соответственно.

Энергия Гиббса изменения трансляционных и ротационных степеней свободы может быть записана в стандартном виде: $\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T \Delta S_{tr}$, $\Delta G_{rot} = \Delta H_{rot} - T \Delta S_{rot}$, где $\Delta H_{tr} = \Delta H_{rot} = -\frac{3}{2} RT$ – энтальпийный эквивалент изменения трансляционных и ротационных степеней свободы, соответственно, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Из классической статистической термодинамики известны выражения для молярных трансляционной и ротационной энтропий:

$$S_{tr} = R \left[\frac{5}{2} + \frac{3}{2} \ln \frac{2\pi mkT}{h^2} - \ln \frac{N}{V} \right], \quad S_{rot} = R \left[\frac{3}{2} + \frac{1}{2} \ln \pi I_x I_y I_z + \frac{3}{2} \ln \frac{8\pi^2 kT}{h^2} - \ln \sigma \right], \quad (6)$$

где $N = N_A = 6.02 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹; $V = 10^{-3}$ м³, k и h – константы Больцмана и Планка, соответственно, I_x, I_y, I_z – главные моменты инерции молекул, σ – параметр симметрии, для несимметричных комплексов равный единице. Значения моментов инерции для мутагенов, 10-мера ДНК и их комплексов получены с помощью программы X-PLOR.

На основании выражений (6) могут быть вычислены изменения трансляционной и ротационной энтропий при комплексообразовании лиганда (D) с дуплексом ДНК (N_2):

$$\Delta S = S^{DN_2} - S^D - S^{N_2}.$$

Из классической термодинамики также следуют выражения для расчета изменений в энтропии и энтальпии вибраций I рода:

$$S_{vib}^I = \frac{1}{T} \sum_{j=1}^{3N-6} \frac{h\nu_j}{e^{h\nu_j/kT} - 1} - k \ln \left(1 - e^{-h\nu_j/kT} \right), \quad H_{vib}^I = \sum_{j=1}^{3N-6} \frac{h\nu_j}{e^{h\nu_j/kT} - 1} + \frac{h\nu_j}{2},$$

где ν_j – нормальные моды колебаний, рассчитанные при помощи пакета HyperChem методом РМЗ; N – число атомов.

При вычислении энергетического вклада механических вибраций мутагенов в составе комплекса с ДНК (вибрации II рода) были использованы выражения для вибрационной статистической суммы Z_{vib} и химического потенциала μ_{vib} :

$$Z_{vib} = \frac{kT}{h\nu}, \quad \mu_{vib} = -RT \frac{\partial}{\partial N} \ln(Z_{vib})^N = -RT \ln \frac{kT}{h\nu}. \quad (7)$$

Из (7) могут быть получены выражения для расчета термодинамических функций:

$$\begin{aligned} \Delta H_{vib}^{II} &= 3kT^2 \frac{\partial}{\partial T} \ln(Z_{vib})^N = 3RT, \\ \Delta S_{vib}^{II} &= -\frac{\partial \mu_{vib}}{\partial T} = R \ln \frac{kT}{h\nu} + R, \\ \Delta G_{vib}^{II} &= \Delta H_{vib}^{II} - T\Delta S_{vib}^{II}. \end{aligned} \quad (8)$$

При этом классическая частота механических колебаний ν в выражениях (7),(8) имеет стандартный вид

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2K}{m_{red}}}, \quad (9)$$

где m_{red} – приведенная масса взаимодействующих молекул $\frac{1}{m_{red}} = \frac{1}{m} + \frac{1}{M}$; K – силовая константа.

Величина K может быть оценена на основании квадратичной аппроксимации потенциальной энергии межмолекулярных взаимодействий мутаген-ДНК $U(x)$ в приближении малых колебаний вдоль данной оси:

$$U = U_0 + K(x - x_0)^2. \quad (10)$$

Вычисление потенциальной энергии U производилось при помощи программы X-PLOR. Затем эта расчетная зависимость аппроксимировалась выражением (10), что позволило получить величины K и ν по формуле (9) для всех трех осей x, y, z . Результаты вычислений представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Энергетический вклад энтропийных составляющих (ккал/моль) при комплексообразовании мутагенов с 10-мером ДНК

Лиганд	Трансляционные			Ротационные			Вибрационные I рода			Вибрационные II рода			ΔG_{entr}
	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG	
EB	-0.9	10.9	10.0	-0.9	10.3	9.4	0.8	-5.1	-4.3	1.8	-9.4	-7.6	7.5
PF		10.6	9.7		9.5	8.6					-9.4	-7.6	6.3

Анализ данных таблицы 5 показывает, что компоненты ΔG_{tr} и ΔG_{rot} имеют преимущественно энтропийную природу ($|T\Delta S| > |\Delta H|$) и вносят неблагоприятный вклад в полную энергию связывания. Этот результат является вполне закономерным с учетом энтропийной невыгодности потери трех ротационных и трансляционных степеней свободы при комплексообразовании мутагена с ДНК.

Из таблицы 5 следует также, что изменения вибраций I рода являются энтальпийно невыгодными, но энтропийно выгодными, что можно объяснить образованием новых мод колебаний связей в комплексе мутаген-ДНК. При этом в целом энтропийный фактор является преобладающим, и вибрации I рода благоприятствуют комплексообразованию для обоих рассматриваемых мутагенов. Как видно из таблицы 5, вибрации II рода имеют также преимущественно энтропийную природу и способствуют образованию комплекса, что является результатом энтропийной выгоды образования новой колебательной степени свободы.

В целом, сумма всех энтропийных компонент $\Delta G_{entr} = \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vib}^I + \Delta G_{vib}^{II} > 0$ и дестабилизирует комплексы мутаген-ДНК.

В таблице 6 приведены результаты вычислений различных энергетических составляющих, взятых из таблиц 1-5, в соответствии с уравнением (2), а также экспериментальные величины энергии Гиббса ΔG_{exp} комплексообразования исследуемых мутагенов с ДНК. Добавка на водородное связывание, ΔG_{HB} (см. таблицу 3), включена в электростатическую энергию. Этап раскручивания ДНК не дает вклада в стабилизацию комплексов, поэтому в таблице 6 полная энергия раскручивания представлена как сумма ΔG^{uw} соответствующих ван-дер-ваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий.

Таблица 6 – Составляющие полной энергии связывания мутаген-ДНК (ккал/моль)

Лиганд	Раскручивание	Вставление					ΔG_{total}	ΔG_{exp}
		ΔG_{vdw}	ΔG_{el+HB}	ΔG_{pe}	ΔG_{hyd}	ΔG_{entr}		
EB	12.3	-11.0	16.7	-1.2	-34.5	7.5	-10.3	-9.5 [2]
PF	0.5	1.4	14.2	-1.1	-26.7	6.3	-5.4	-6.0 [10]

Как следует из таблицы 6, в целом наблюдается хорошее совпадение расчетной ΔG_{total} и экспериментальной ΔG_{exp} энергий. При этом необходимо помнить о том, что числа, представленные в таблице 6, являются суммой шести различных энергетических составляющих, рассчитанных разными методами, а также являющихся суммой энергий внутри- и межмолекулярных взаимодействий, и взаимодействия с растворителем. При этом модуль каждого из указанных компонентов может достигать сотни ккал/моль (см. таблицу 2), что означает соизмеримость ошибки вычисления полной энергии $\Delta \Delta G_{total}$ в таблице 6 с самой энергией ΔG_{total} . Поэтому анализ расчетных значений полной энергии Гиббса реакций комплексообразования лишен смысла; имеет смысл лишь сравнение расчетных величин отдельных составляющих полной энергии, отвечающих вкладу различных физических факторов. На рисунке 2 в виде диаграмм показаны энергетические составляющие различных физических взаимодействий.

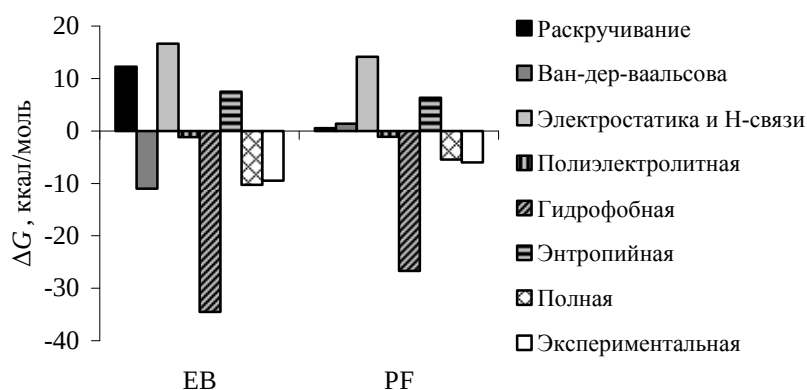


Рисунок 2 – Вклады различных составляющих в полную энергию Гиббса комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК

Таким образом, на основании сказанного можно заключить, что относительно небольшие величины экспериментальных энергий связывания мутагенов с ДНК являются результатом компенсации больших по абсолютной величине и противоположных по знаку энергий внутри- и межмолекулярных взаимодействий и взаимодействия с водной средой, а также при суммировании отдельных энергетических вкладов от различных физических взаимодействий.

Выводы. Результаты данной работы позволяют сделать вывод о том, что препятствующими комплексообразованию ароматических мутагенов с ДНК являются ван-дер-ваальсовы взаимодействия, водородные связи и энтропийный фактор. В то же время, комплексообразованию способствуют гидрофобный и полиэлектролитный вклады, причем первый оказывается наиболее значимым. Электростатические взаимодействия оказываются выгодными для связывания с ДНК профлавина, а в случае бромистого этидия они препятствуют комплексообразованию. Полученные результаты согласуются с представлением о преобладании стэкинг-взаимодействий в стабилизации комплексов ароматических лигандов с ДНК [1-2], однако, в отличие от предыдущих работ, позволяют оценить вклад основных физических факторов в полную энергию Гиббса реакций комплексообразования ароматических мутагенов с ДНК.

Библиографический список

1. Brana M.F. Intercalators as Anticancer Drugs / M.F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas et al. // *Curr. Pharm. Des.* — 2001. — V. 7. — P. 1745–1780.
2. Chaires J.B. Energetics of Drug–DNA Interactions / J.B. Chaires // *Biopolymers.* — 1998. — V. 44. — P. 201–215.
3. Reha D. Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study / D. Reha, M. Kabelac, F. Ryjacek et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — V. 125. — P. 3366–3376.
4. Cieplak P. Free Energy Calculation on Base Specificity of Drug-DNA Interactions: Application to Daunomycin and Acridine Intercalation into DNA / P. Cieplak, S.N. Rao, P.D.J. Grootenhuys et al. // *Biopolymers.* — 1990. — V. 29. — P. 717–727.
5. Feigon J. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: ^1H NMR study of binding mode and kinetics / J. Feigon, W.A. Denny, W. Leupin et al. // *J. Med. Chem.* — 1984. — V. 27. — P. 450–465.
6. Makhatadze G.I. Energetics of protein structure / G.I. Makhatadze, P.L. Privalov // *Adv. Protein Chem.* — 1995. — V. 47. — P. 307–425.
7. Kostjukov V.V. Electrostatic contribution to the energy of binding of aromatic ligands with DNA / V.V. Kostjukov, N.M. Khomytova, M.P. Evstigneev et al. // *Biopolymers.* — 2008. — V. 89. — P. 680–690.
8. Lazaridis T. Entropy of hydrophobic hydration: a new statistical mechanical formulation / T. Lazaridis, M.E. Paulaitis // *J. Phys. Chem.* — 1992. — V. 96. — P. 3847–3855.
9. Tidor B. The contribution of vibrational entropy to molecular association. The dimerization of insulin / B. Tidor, M. Karplus // *J. Mol. Biol.* — 1994. — V. 238. — P. 405–414.
10. Aslanoglu M. Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of proflavine with DNA / M. Aslanoglu // *Analyt. Sci.* — 2006. — V. 22. — P. 439–443.

Поступила в редакцию 15.01.2009 г.