

УДК 577.113:577.32

В.В. Костюков, ассистент**Н.М. Хомутова, студент***Севастопольский национальный технический университет**ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053**E-mail: Viktor_Kostukov@mail.ru***АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ВКЛАДА В ЭНЕРГИЮ****КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ С ДНК**

Произведен расчет электростатических взаимодействий при комплексообразовании бромистого этидия и профлавина с олигонуклеотидными дуплексами, содержащими от 4 до 16 пар оснований. Проведен анализ главных компонентов электростатической энергии. Исследовано влияние длины двойной спирали ДНК на величину энергии электростатических взаимодействий. Обнаружено, что расчетные значения энергий для олигомеров ДНК с 8 и более парами оснований хорошо согласуются между собой. Показано, что в целом, электростатические взаимодействия препятствуют связыванию обоих ароматических лигандов с ДНК, несмотря на положительные заряды их молекул.

Ключевые слова: комплексообразование с ДНК, ароматический мутаген, электростатический вклад, DelPhi

Введение. Некоторые ароматические биологически активные соединения (БАС) являются лекарственными препаратами, широко используемыми в клинической практике [1]. Действие многих из них основано на интеркаляционном связывании с ДНК в клетке с последующим ингибированием репликации и транскрипции [1]. Поэтому исследование взаимодействия ароматических молекул с ДНК представляется важным как для понимания механизма действия лекарственных БАС, так и для создания новых, более эффективных препаратов.

При изучении межмолекулярных взаимодействий в растворе большую роль играет знание физических факторов, которые стабилизируют комплексы, и их относительных вкладов в полную свободную энергию комплексообразования $\Delta G_{\text{эксп}}$, измеряемую в эксперименте. Главными компонентами наблюдаемой величины $\Delta G_{\text{эксп}}$ в водно-солевом растворе являются гидрофобные, электростатические, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, водородные связи, а также энтропийный вклад от изменения поступательных, вращательных и колебательных степеней свободы молекул и высвобождения протонированных групп при образовании комплексов [2].

Электростатический вклад $\Delta G_{\text{эл}}$ является одним из важнейших при образовании комплексов биомолекул. Он включает внутри- и межмолекулярные кулоновские взаимодействия парциальных атомных зарядов, взаимодействие с индуцированными зарядами гидратной оболочки и взаимодействие с противоионами [3]. При этом роль электростатических взаимодействий при связывании ароматических молекул с ДНК является слабо исследованной. К настоящему времени детальное исследование электростатического вклада в энергию комплексообразования с ДНК выполнено только для антибиотика дауномицина и его производных [4], а также красителей DAPP [5] и 9-аминоакридина [6]. В ряде работ рассмотрена лишь полиэлектролитная составляющая электростатической энергии [2 и ссылки в ней].

В данной работе методом, основанным на решении нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана, проведено вычисление и сравнительный анализ электростатической составляющей полной энергии комплексообразования ароматических мутагенов бромистого этидия (ЕВ) и профлавина (РФ) с олигомерами ДНК различной длины (от 4 до 16 пар оснований).

Фенантридиновый мутаген бромистый этидий (рисунок 1,а) встраивается в двойную спираль ДНК путем интеркаляции хромофора со стороны малой канавки, в которой размещается его фенольное кольцо. При этом продольная ось хромофора лиганда примерно параллельна большим осям пар оснований участка встраивания. Такое положение хромофора ЕВ может дополнительно стабилизироваться водородной связью между аминогруппой лиганда и фосфатом ДНК сайта интеркаляции [7]. Акридиновый краситель профлавин (рисунок 1,б) связывается с дуплексом ДНК путем интеркаляционного встраивания со стороны большой канавки [8]. Как и в случае ЕВ, большие оси хромофора РФ и пар оснований сайта встраивания приблизительно параллельны. Отличный от ЕВ способ интеркаляции обусловлен, главным образом, большей длиной хромофора РФ (см. рисунок 1), что создает большие стерические препятствия при вставлении между парами оснований. Так же, как и для комплексообразования с ДНК ЕВ, при интеркаляции РФ возможно образование Н-связей между фосфатом ДНК и аминогруппой лиганда.

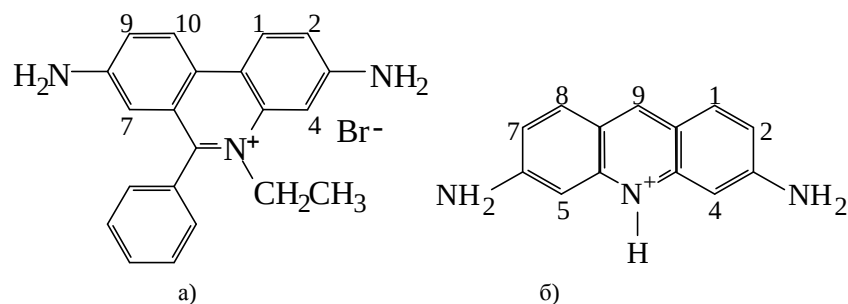


Рисунок 1 – Структурні формули мутагенів бромистого етидія (а) і профлавіна (б)

Методи. В настоящей работе вычисление электростатической энергии биомолекул и их комплексов в водно-солевом растворе проведено при помощи решения нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана (НУПБ) методом конечных разностей при неявном задании водно-солевого окружения [3-6].

Полная электростатическая энергия Гиббса $\Delta G_{эл}$ молекулы в водном растворе в присутствии одновалентных ионов соли рассчитывается из НУПБ [3]:

$$\nabla[\epsilon(\vec{r})\nabla\varphi(\vec{r})] - \frac{8\pi e^2 I}{kT} \sinh[\varphi(\vec{r})] + \frac{4\pi e \rho_\phi(\vec{r})}{kT} = 0, \quad (1)$$

где φ – безразмерный электростатический потенциал в данной точке в единицах kT/e ;

k – постоянная Больцмана;

T – абсолютная температура;

ϵ – диэлектрическая проницаемость среды;

ρ_ϕ – плотность фиксированных зарядов, т.е. зарядов данной молекулы;

I – макроскопическая ионная сила раствора (вдали от данной молекулы);

$\vec{r}$ – радиус-вектор данной точки.

При этом величина $\Delta G_{эл}$ может быть вычислена как

$$\Delta G_{эл} = \iiint_{\infty} \left\{ \frac{\rho_\phi \Phi_\phi}{2} + \rho_\phi \Phi_m + \frac{\rho_m \Phi_m}{2} - (\rho_m \Phi + kTc[2 \cosh(\varphi) - 2]) \right\} dV, \quad (2)$$

где Φ_ϕ и Φ_m – потенциалы, создаваемые фиксированными и подвижными (ионными) зарядами, соответственно, при этом $\Phi_\phi + \Phi_m = \Phi$; c – концентрация соли; ρ_m – плотность подвижных зарядов.

Практически, при решении (1) методом конечных разностей, расчет φ проводится внутри определенного объема, как правило, кубической формы, который разделяется на ячейки, настолько малые, что значение φ внутри каждой ячейки можно считать с заданной точностью постоянным [3-6].

Водно-солевое окружение в методе НУПБ задается неявно. Молекула растворенного вещества в рамках данной модели представляется в виде полости с малой величиной ϵ_n , отделенной от водного окружения с высоким значением диэлектрической проницаемости ϵ_v доступной для растворителя поверхностью (solvent accessible surface). Распределение противоионов вокруг молекулы растворенного вещества ограничивается толщиной исключенного слоя (слой Штерна).

В данной работе решение НУПБ (1) и расчет $\Delta G_{эл}$ выполнены с помощью программы DelPhi (версия 4.0). С помощью DelPhi вычислены следующие составляющие $\Delta G_{эл}$: энергия взаимодействия молекул растворенных веществ с противоионами ΔG_n ; энергия взаимодействия зарядов атомов растворенного вещества с индуцированными поверхностными зарядами на границе раздела с водой (энергия сольватации ΔG_c); энергия кулоновских взаимодействий между атомами растворенных веществ ΔG_k :

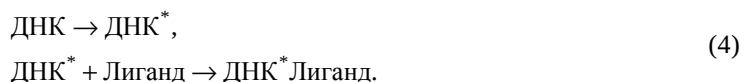
$$\Delta G_{эл} = \Delta G_n + \Delta G_c + \Delta G_k. \quad (3)$$

При расчете электростатических потенциалов вокруг молекул ДНК, БАС и их комплексов использован объем кубической формы с ребром 75 Å, разделенным на кубические ячейки с ребром 0,5 Å [3-6]. Диэлектрическая проницаемость внутри молекул растворенных веществ принята $\epsilon_n = 4$, а водного окружения $\epsilon_v = 80$ [3-6]. Концентрация ионов Na^+ принималась равной 0.1 М, значение температуры раствора $T = 298$ К. Радиус пробной сферы для определения поверхности раздела двух сред принят равным 1.4 Å, а ван-дер-ваальсов радиус иона натрия $r_n = 2,0$ Å [3-6]. Число итераций при решении НУПБ (1) принималось равным 1000.

Пространственные структуры лигандов EB и PF взяты из Protein Data Bank (PDB IDs 1JTY и 1QVT, соответственно). Пространственные структуры комплексов ДНК с БАС построены с помощью

программы X-PLOR (версия 3.1). Пространственная структура самокомплементарного 16-мера В-ДНК d(CGCGCTCGACGCGCG)₂ построена с помощью программы HyperChem 8.0 (Hypercube, Inc., Toronto, Canada). Величины ван-дер-ваальсовых радиусов и зарядов атомов ДНК в настоящей работе соответствуют силовому полю AMBER для нуклеиновых кислот. Заряды атомов ЕВ и РГ взяты из работ [7,9]. Ван-дер-ваальсовы радиусы атомов лигандов также соответствуют полю AMBER.

Результаты и обсуждение. Образование комплекса интеркалятора с ДНК может быть рассмотрено как процесс из двух этапов: образование интеркаляционной полости в дуплексе ДНК (т.е. переход спирали ДНК из В-формы в раскрученную (unwound) ДНК*) и встраивание лиганда в раскрученную ДНК [4,5]:



Энергетические эффекты обоих этапов комплексообразования имеют электростатическую составляющую, при этом суммарный электростатический вклад $\Delta G_{\text{эл}}$ может быть представлен как

$$\Delta G_{\text{эл}} = \Delta G_{\text{р}} + \Delta G_{\text{в}}, \quad (5)$$

где $\Delta G_{\text{р}}$ и $\Delta G_{\text{в}}$ – вклады раскручивания В-ДНК и встраивания в нее молекулы БАС, соответственно. Каждый из этих вкладов, в свою очередь, рассчитывается как сумма трех составляющих (3).

Для установления оптимальной для проведения расчетов длины фрагмента в данной работе использованы дуплексы ДНК, содержащие от 4 до 16 пар оснований. Дальнейшее увеличение длины последовательности не представляется целесообразным, поскольку при ионной силе 0.1 М, принятой в настоящей работе, концевые эффекты, могущие оказывать влияние на электростатический потенциал, распространяются не более чем на 5 пар оснований.

Специфичность интеркаляторов ЕВ и РГ к определенным последовательностям ДНК не сильно выражена, однако они проявляют определенную специфичность с CG-сайту [7,8]. Поэтому в качестве участка посадки лигандов в данной работе был принят самокомплементарный фрагмент d(TCGA)₂, фланкируемый с концов CG-парами. Таким образом, формирование олигонуклеотидных дуплексов производилось по формуле (CG)_n(TCGA)(CG)_n при $n = 0, 1, 2, 3$.

Образование интеркаляционного сайта (центральный CG-сайт) для каждого лиганда проводилось на 16-мере [(CG)₃(TCGA)(CG)₃]₂ путем отодвигания половины всех его атомов вдоль оси спирали на 3.4 Å и их поворотом вокруг нее на угол $\Delta\Omega$, значения которого принимались равными величинам $\Delta\Omega$ при интеркаляции соответствующих БАС в двойную спираль ДНК. Молекула РГ встраивались в CpG сайт ДНК со стороны большой канавки, а ЕВ – со стороны малой канавки. Структуры олигомеров ДНК меньшей длины были получены из первоначального 16-мера удалением концевых пар оснований. Аналогично получены и комплексы БАС с дуплексами ДНК от 4-мера до 14-мера (рисунок 2).

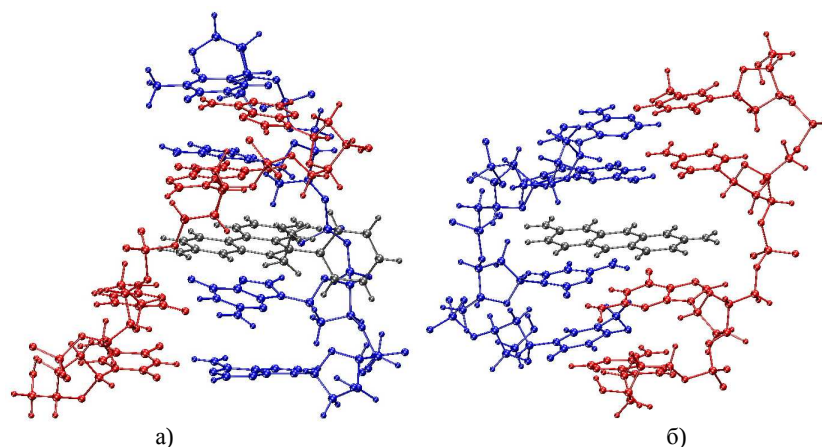


Рисунок 2 – Расчетные пространственные структуры комплексов дуплекса тетрамера ДНК d(TCGA)₂ с бромистым этидием (а) и профлавином (б)

Изменение электростатического компонента энергии Гиббса на этапах раскручивания ДНК, встраивания лиганда и полной энергии всего процесса интеркаляции мутагенов представлены в таблице 1.

На рисунке 3 показаны зависимости компонент $\Delta G_{\text{с}}$ и $\Delta G_{\text{к}}$ и полной электростатической энергии $\Delta G_{\text{эл}}$ связывания лигандов от длины олигомера ДНК N . С увеличением числа пар оснований N значения сольватационной и кулоновской компонент энергии линейно возрастают по абсолютной величине. Однако для обоих мутагенов значения полной электростатической энергии $\Delta G_{\text{эл}}$ не проявляют

существенной корреляции с N . Отметим при этом, что суммарная энергия $\Delta G_{\text{эл}}$ сохраняет знак при любых N .

Таблица 1 – Расчетные значения энергии Гиббса (ккал/моль) процессов раскручивания ДНК при интеркаляции ароматических мутагенов и вставки лиганда в интеркаляционную полость, а также полной электростатической энергии комплексообразования БАС с олигомерами ДНК различной длины

N	Раскручивание ДНК				Вставка лиганда				Полная			
	$\Delta G_{\text{и}}$	$\Delta G_{\text{с}}$	$\Delta G_{\text{к}}$	$\Delta G_{\text{р}}$	$\Delta G_{\text{и}}$	$\Delta G_{\text{с}}$	$\Delta G_{\text{к}}$	$\Delta G_{\text{в}}$	$\Delta G_{\text{и}}$	$\Delta G_{\text{с}}$	$\Delta G_{\text{к}}$	$\Delta G_{\text{эл}}$
<i>N</i> -мер+EB												
4	0,0	-0,7	-0,2	-1,0	1,4	76,2	-66,7	10,9	1,4	75,5	-66,9	10,0
6	-0,4	1,1	-2,1	-1,4	2,7	108	-100	10,8	2,4	109	-102	9,4
8	-0,2	12,6	-14,7	-2,2	4,4	131	-124	11,2	4,3	144	-139	9,0
10	0,5	26,4	-29,1	-2,2	5,4	150	-144	10,8	5,9	176	-174	8,6
12	1,3	40,6	-44,0	-2,1	6,3	167	-162	10,8	7,6	207	-206	8,7
14	2,2	55,4	-59,6	-2,1	7,0	182	-178	10,9	9,1	237	-237	8,8
16	3,1	69,3	-74,1	-1,7	7,7	195	-192	10,9	10,8	265	-266	9,2
<i>N</i> -мер+PF												
4	0,0	-2,3	1,3	-1,0	1,2	65,6	-60,2	6,6	1,2	63,3	-58,8	5,6
6	-0,4	0,5	-2,0	-1,8	2,3	91,3	-87,0	6,6	1,9	91,9	-89,0	4,8
8	-0,2	11,2	-13,1	-2,1	3,7	111	-108	6,6	3,5	122	-121	4,5
10	0,5	24,4	-27,1	-2,3	4,6	127	-125	6,5	5,0	152	-152	4,3
12	1,2	37,8	-41,6	-2,6	5,4	142	-141	6,6	6,6	180	-182	4,0
14	2,1	52,5	-56,8	-2,2	6,0	154	-154	6,5	8,1	207	-211	4,3
16	3,0	66,3	-71,0	-1,6	6,6	166	-166	6,5	9,6	232	-237	4,9

Согласно расчетам, изменение электростатической составляющей энергии взаимодействия с водным окружением $\Delta G_{\text{с}}$ при раскручивании ДНК для обоих лигандов положительно (см. таблицу 1). Это объясняется тем, что при раскручивании ДНК увеличивается ее длина, следовательно, плотность заряда на поверхности уменьшается, что приводит к ослаблению взаимодействия с водным окружением [4].

Вклад кулоновских взаимодействий в свободную энергию при раскручивании $\Delta G_{\text{к}}$ для обоих мутагенов отрицателен (см. таблицу 1), т.е. это взаимодействие способствует раскручиванию дуплекса ДНК. Такая закономерность вызвана удалением друг от друга отрицательно заряженных фосфатов при образовании полости интеркаляции, что представляет собой энергетически выгодный процесс. Это согласуется с результатами расчета $\Delta G_{\text{к}}$ для антрациклиновых производных в работе [4].

Согласно расчетам (см. таблицу 1), для обоих мутагенов значения сольватационной составляющей $\Delta G_{\text{с}}$ при вставлении лиганда положительны. В свою очередь, изменение энергии атомного кулоновского взаимодействия $\Delta G_{\text{к}}$ отрицательно. Такую закономерность можно объяснить тем, что молекулы данных мутагенов несут единичный положительный заряд. При интеркаляции положительно заряженных молекул в двойную спираль ДНК их заряды локально компенсируют отрицательный заряд ближайших фосфатов ДНК, что приводит к общему ослаблению электростатического взаимодействия с растворителем. Также это обеспечивает энергетически выгодное электростатическое взаимодействие между положительно заряженными молекулами БАС и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, что приводит к большим по абсолютной величине отрицательным значениям $\Delta G_{\text{к}}$.

Вклад взаимодействий с ионным окружением $\Delta G_{\text{и}}$ на этапах раскручивания ДНК (см. таблицу 1) в целом положителен для всех рассмотренных лигандов, причем значения энергии $\Delta G_{\text{и}}$ практически на порядок ниже по абсолютной величине в сравнении с $\Delta G_{\text{с}}$ и $\Delta G_{\text{к}}$. Так же, как и для составляющей $\Delta G_{\text{с}}$, рассмотренной выше, положительный знак $\Delta G_{\text{и}} > 0$ обусловлен удлинением ДНК при раскручивании, уменьшением плотности заряда и соответствующим уменьшением взаимодействия с ионным окружением.

Как видно из таблицы 1, значения электростатической составляющей $\Delta G_{\text{эл}}$ являются суммой больших чисел (5) и для обоих лигандов оказываются сравнительно малыми положительными величинами, что также согласуется с результатами работ [4-6]. Следовательно, электростатические взаимодействия при комплексообразовании, в целом, являются энергетически невыгодными и препятствуют образованию комплексов ДНК с ароматическими БАС.

Полученные значения энергии кулоновских взаимодействий $\Delta G_{\text{к}}$ при связывании олигомеров ДНК с EB и PF находятся в хорошем соответствии с величинами, рассчитанными квантово-механически в работе [10] для связывания с дуплексом ДНК 9-аминоакридина (-216.1 ккал/моль) и EB (-237.4 ккал/моль).

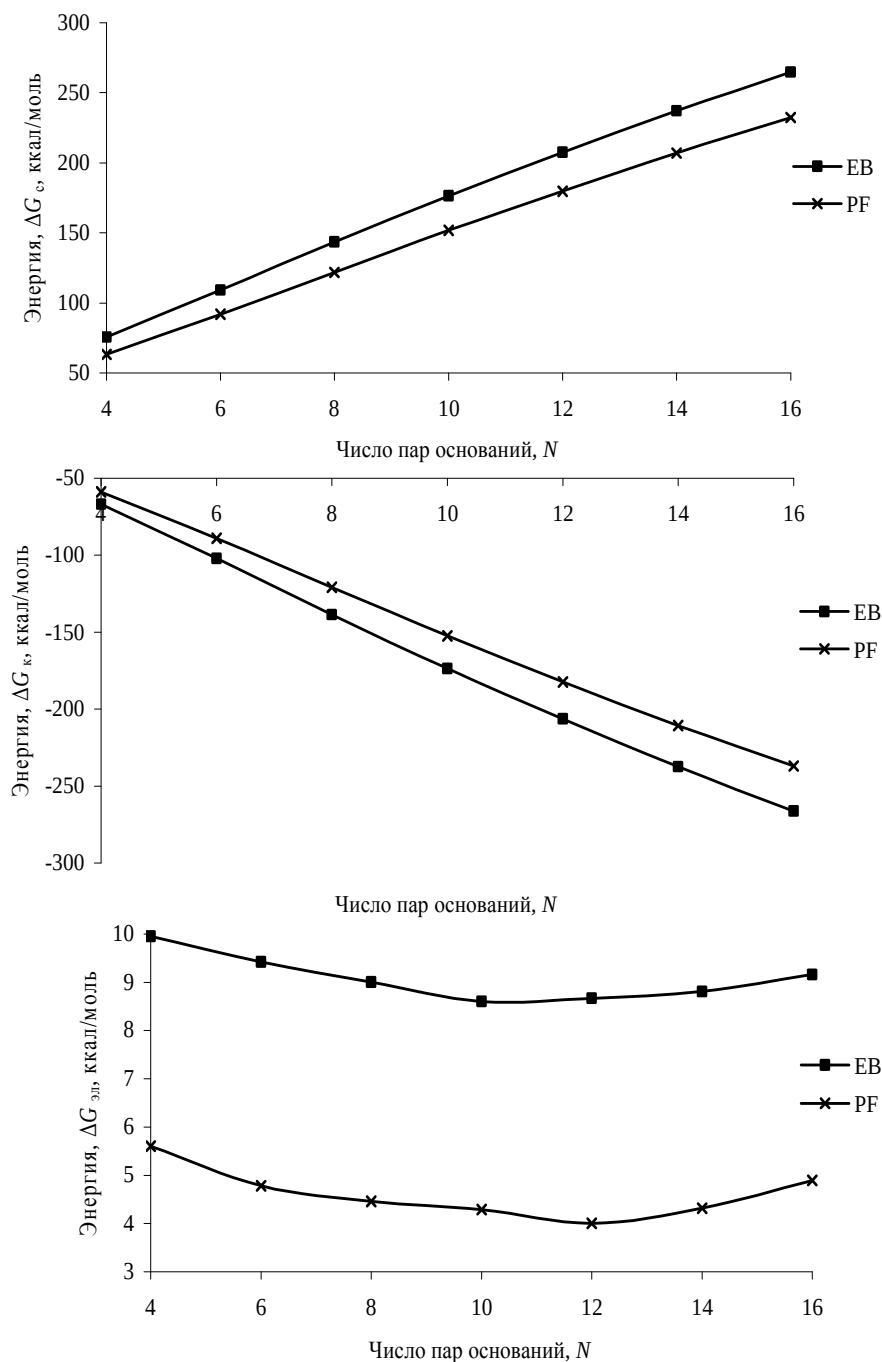


Рисунок 3 – Зависимость составляющих электростатической энергии ΔG_c и ΔG_k , а также полной энергии $\Delta G_{эл}$ от числа пар оснований N олигонуклеотида

Вывод. В данной работе путем решения нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана выполнен расчет компонент суммарной электростатической энергии образования комплексов ароматических мутагенов с ДНК в водно-солевом растворе. Общая методика работы состоит в разделении процесса интеркаляции на два этапа: образования индивидуальной для каждого лиганда интеркаляционной полости и вставления в нее лиганда, и последующем расчете энергии электростатических взаимодействий на каждом из этих этапов как суммы энергий взаимодействия с водной средой и взаимодействия атомных зарядов лиганда и ДНК. На основании анализа полученных результатов можно сделать вывод о том, что электростатические взаимодействия, в целом, дестабилизируют комплексы «мутаген-ДНК» в водной среде ($\Delta G_{эл} > 0$). При этом их энергия определяется как сумма больших по величине и противоположных по знаку электростатических компонентов от взаимодействия комплекса с водным окружением и кулоновского взаимодействия атомных зарядов лиганда и ДНК. Поэтому корректный анализ электростатического вклада в энергию

комплексообразования интеркаляторов с ДНК должен проводиться с одновременным учетом этих двух составляющих.

Библиографический список

1. Intercalators as Anticancer Drugs / M.F. Brana [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. Honig B. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry / B. Honig, A. Nicholls // Science. — 1995. — V. 268. — P. 1144–1149.
4. Baginski M. Electrostatic and Non-electrostatic Contributions to the Binding Free Energies of Anthracycline Antibiotics to DNA / M. Baginski, F. Fogolari, J.M. Briggs // J. Mol. Biol. — 1997. — V. 274. — P. 253–267.
5. Misra V.K. On the Magnitude of the Electrostatic Contribution to Ligand–DNA Interactions / V.K. Misra, B. Honig // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — V. 92. — P. 4691–4695.
6. Zakrzewska K. Poisson-Boltzmann calculations for nucleic acids and nucleic acids complexes / K. Zakrzewska, A. Madami, R. Lavery // Chem. Phys. — 1996. — V. 204. — P. 263–269.
7. 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 [et al.] // J. Am. Chem. Soc. — 2003. — V. 125. — P. 3366–3376.
8. A molecular model for proflavine–DNA intercalation / S. Neidle [et al.] // Nucleic Acids Res. — 1988. — V. 16. — P. 8999–9016.
9. Free energy calculations on base specificity of drug–DNA interactions: Application to daunomycin and acridine intercalation into DNA / P. Cieplak [et al.] // Biopolymers. — 1990. — V. 29. — P. 717–727.
10. Electrostatic Factors in DNA Intercalation / C. Medhi, J.B.O. Mitchell, S.L. Price [et al.] // Biopolymers. — 1999. — V. 52. — P. 84–93.

Поступила в редакцию 20.02.2008 г.