

УДК 539.193

М.П. Евстигнеев, д-р физ.-мат. наук, профессор

Севастопольский национальный технический университет

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

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ФОРМ МОЛЕКУЛ ДНК БИС-ИНТЕРКАЛЯТОРОВ

Методами молекулярной механики проведено моделирование структур открытой и закрытой форм мономера ДНК бис-интеркалятора гомодимера этидия.

Ключевые слова: ДНК бис-интеркалятор, гомодимер этидия, внутримолекулярная трансформация

Введение

Молекулы ДНК бис-интеркаляторов, образованные соединением двух одинаковых или разных ароматических хромофоров линкером определенной длины, представляют собой достаточно интересные соединения как с физико-химической, так и с медико-биологической точек зрения. Бис-интеркаляторы, по сравнению с классическими моноинтеркаляторами типа бромистого этидия или профлавина, способны обоими хромофорами интеркалировать в дуплекс ДНК, что приводит к резкому увеличению константы связывания таких молекул с нуклеиновыми кислотами и, одновременно, повышению специфичности к определенным последовательностям оснований [1, 2]. В работах [3, 4] показано, что некоторые представители группы бис-интеркаляторов способны преодолевать специфическую резистентность болезнетворных организмов и опухолевых клеток к традиционным лекарственным препаратам, и в связи с этим имеют перспективу для внедрения в клиническую практику.

Вплоть до недавнего времени считалось, что равновесие бис-интеркаляторов в водном растворе ограничивается схемой «мономер-димер» по аналогии с ароматическими моноинтеркаляторами. Однако в работах [5, 6] было впервые показано, что типичные бис-интеркаляторы, гомодимеры этидия и акридина образуют в растворе сложные агрегаты, включающие взаимно-интеркалированные димеры и тримеры. Более того, в работе [6] был сделан вывод о том, что взаимодействие моно- и бис-интеркаляторов может характеризоваться высокой константой гетероассоциации, что, в свою очередь, позволяет рассматривать бис-интеркаляторы в качестве эффективных молекул-перехватчиков моноинтеркаляторов.

Информация о структуре сложных комплексов, образуемых в физиологическом растворе бис-интеркаляторами, в настоящее время отсутствует, за исключением схематических структур, полученных в работах [5, 6] на основании данных ЯМР. Целью данной работы является выявление структурных особенностей различных форм молекул типичного ДНК бис-интеркалятора – гомодимера этидия (ЕВН, рисунок 1) – для углубления представлений о характере комплексообразования соединений этой группы в растворе.

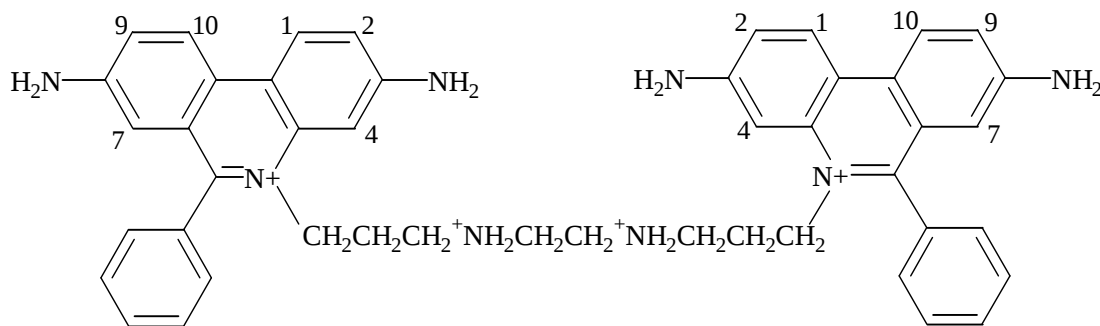


Рисунок 1 – Структурная формула молекулы гомодимера этидия (ЕВН)

Метод структурного анализа

Расчет пространственных структур мономеров ЕВН в водном окружении проводился методом молекулярной механики с использованием программы X-PLOR и силового поля Charmm22. Моделирование водного окружения выполнялось молекулами воды в виде ТРЗР, помещенных в прямоугольный бокс (1100 молекул). Топология гомодимера этидия и параметризация его валентных взаимодействий была получена с помощью программы XPLO2D с использованием кристаллической структуры мономерного бромистого этидия (ЕВ, один из хромофоров ЕВН на рисунке 1) из PDB банка данных. Параметры невалентных взаимодействий между атомами соответствовали силовому полю ММ3. Исходная для последующего моделирования структура молекулы ЕВН была получена путем сопряжения

отдельно минимизированных на уровне HF/6-31G* двух хромофоров ЕВ и связывающего их аминокислотного линкера (см. рисунок 1).

Результаты и обсуждение

Как указывалось во введении, с точки зрения структурного анализа основное достижение работ [5,6] заключалось в схематическом изображении наиболее вероятных структур комплексов молекул ЕВН в виде схемы реакций как на рисунке 2.

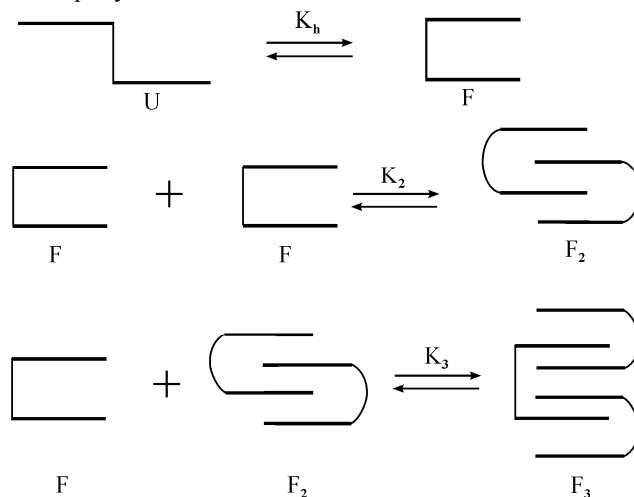


Рисунок 2 – Схематическое изображение реакций комплексообразования с участием молекулы ЕВН [5]

На рисунке U , F , F_2 и F_3 обозначают, соответственно, открытую, закрытую формы мономера ЕВН, взаимноинтеркалированные димер и тример. Эти схематические изображения послужили основой для задания начальных структур для последующей минимизации по энергии методами молекулярного моделирования.

Моделирование изгиба линкера

Линкер, соединяющий хромоферы гомодимера этидия, является важнейшим структурным элементом бис-интеркалятора, существенно влияющим на его конформационные состояния. В связи с этим первым этапом настоящей работы явилось выяснение способности линкера к изгибу в водной среде.

В работе [5] было сделано предположение, что структура линкера должна отличаться в димере и тримере. В димере линкер изогнут так, что хромоферы ЕВН сближаются на достаточное расстояние, при котором между ними может возникать эффективный стэкинг, стабилизирующий димер (см. рисунок 2). В свою очередь, в тримере линкер, по-видимому, выпрямлен, что создает необходимые стерические условия для проникновения двух хромофоров ЕВН внутрь F формы при образовании тримера (см. рисунок 2). Приведенные заключения были сделаны эмпирически на основании анализа магнитного экранирования протонов в F_2 и F_3 формах.

В настоящей работе нами проведено моделирование изгиба линкера с целью выяснения стерических ограничений на образование димера ЕВН. Для этого необходимо оценить минимальное расстояние между хромофорами, при котором линкер еще не является напряженным. Мерой напряженности структуры были выбраны величины двугранных углов α линкера (образованных одинарными связями атомов углерода), которые в общем случае могут принимать значения в пределах от 100° до 150° . В связи с этим предельным значением углов «ненапряженного» линкера было принято значение $\alpha \geq 100^\circ$. В результате последующей минимизации по энергии были получены значения двугранных углов, представленные в таблице 1, как функции расстояния между хромофорами (расстояние измерялось по 3,7-аминогруппам фенантридинового хромофора, см. рисунок 1).

Анализ данных таблицы позволяет сделать вывод о том, что минимальное расстояние между хромофорами F -формы бис-интеркалятора, при котором линкер является относительно ненапряженным, соответствует 8 Å. Последующий запуск процедуры молекулярной динамики приводит к выпрямлению линкера до длины ≈ 10 Å, сохраняющейся практически неизменной в процессе эволюции системы. Это позволяет сделать вывод о том, что стэкинг-взаимодействия хромофоров в F -форме отсутствуют и не определяют реакцию внутримолекулярной трансформации $U \leftrightarrow F$. Следовательно, малое магнитное экранирование ароматических протонов феноксазоновых хромофоров в F -форме, установленное в работе [5], не связано с эффектом взаимодействия хромофоров, а является следствием изменения локального экранирования, обусловленного внутримолекулярной перестройкой молекулы ЕВН при переходе из U в F форму.

Таблица 1 – Величины двугранных углов линкера при различных расстояниях между хромофорами в *F*-форме

Угол	10 Å	9 Å	8 Å	7 Å	6 Å	5 Å	4 Å
C33 – C26 – C25	120,9	136,2	144,8	157,8	162,4	169,1	171,8
C26 – C25 – N5	118,7	111,3	111, 2	113,7	115,3	117,9	129,1
C25 – N5 – C24	108,6	117,1	118,9	125,2	128,2	134,3	149,1
N5 – C24 – C23	117,4	108,6	99, 9	87,6	83,9	79,5	76,8
C24 – C23 – N4	116,1	119,9	118,8	115,9	113,9	111,1	109,4
C23 – N4 – C22	110,6	113,3	111,3	109,2	108,7	108,3	129,3
N4 – C22 – C21	116,2	122,2	120,8	119,2	118,4	116,5	119,3
C22 – C21 – C14	112,7	104,3	103,8	105,3	105,9	107,1	122,7

Структурный анализ *U* и *F* форм

На рисунке 3 представлены минимизированные по энергии структуры *F*-формы гомодимера этидия, соответствующие частично напряженному и полностью ненапряженному состоянию линкера. В напряженном состоянии плоскости хромофоров находятся под углом примерно 20° друг к другу, в то время как в ненапряженной структуре хромофоры практически параллельны друг другу. Существование стабильных по энергии конформаций со сближенными до 8 Å и до 10 Å хромофорами подтверждает заключение, сделанное в работах [5, 6] на основании данных ЯМР о возможности образования димера F_2 с изогнутым линкером и тримера F_3 с выпрямленным линкером (см. рисунок 2). К сожалению дальнейшее построение структур F_2 и F_3 комплексов в рамках настоящей работы оказалось невозможным в силу неучета в используемой методике гидрофобного эффекта со стороны водного окружения, по-видимому, являющегося определяющим в стабилизации этих комплексов.

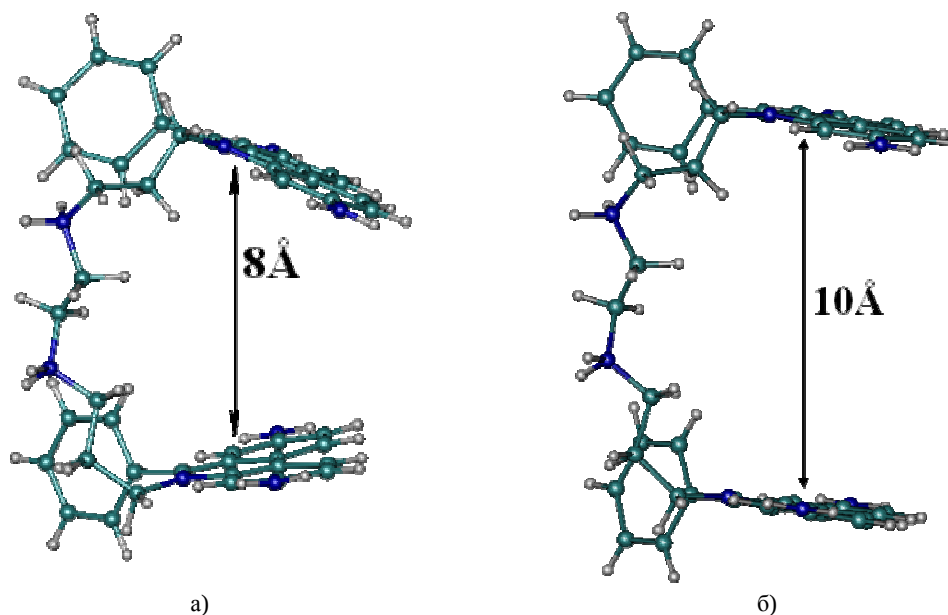


Рисунок 3 – Минимизированные по энергии частично напряженная (а) и ненапряженная (б) структуры *F*-формы ЕВН

С целью установления всех возможных ротамерных форм мономера ЕВН была произведена серия поворотов хромофоров *F*-формы (см. рисунок 2, б) друг относительно друга с одновременным расчетом полной потенциальной энергии системы (рисунок 4).

На рисунке четко видны два максимума, соответствующие значениям углов двух гош – 50° и 140° – конформаций ЕВН, и три четко выраженных, приблизительно одинаковых по энергии минимума, расположенных в окрестности 0°, 110° и 180° и соответствующих цис-, гош- и транс-конформациям молекулы ЕВН. Таким образом, существование открытой *U*-формы (транс-конформация) и закрытой *F*-формы (цис-конформация) бис-интеркалятора напрямую следуют из результатов молекулярного моделирования и согласуются с результатами экспериментальных исследований [5, 6].

Любопытно отметить, что молекулярное моделирование, помимо ожидаемых цис- (0°) и транс- (180°) конформаций, предсказывает существование достаточно стабильной гош-конформации мономера при угле разворота хромофоров 110°. Данный результат является новым и ранее не отмечался.

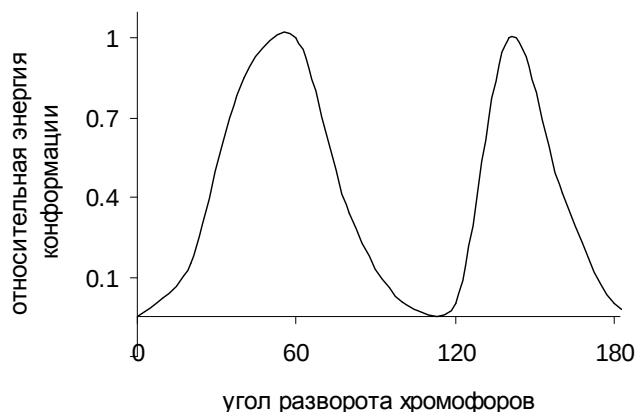


Рисунок 4 – Зависимость относительной внутримолекулярной энергии конформации молекулы ЕВН от угла разворота хромофоров

Заключение

В настоящей работе впервые проведено молекулярное моделирование закрытой и открытой форм молекулы типичного бис-интеркалятора гомодимера этидия. Установлено существование трех стабильных ротамеров ЕВН, два из которых соответствуют известным из литературных данных *U*- и *F*-формам, а третья форма – промежуточная гош-конформация – обнаружена впервые. Показано, что линкер ЕВН может изгибаться от исходной ненапряженной длины 10 Å до частично напряженного состояния с длиной 8 Å. Этот результат подтверждает сделанные ранее на основании данных ЯМР выводы о структуре F_2 и F_3 комплексов молекул ЕВН.

Полученные в настоящей работе результаты могут быть в дальнейшем использованы для проведения структурного анализа более сложных F_2 и F_3 комплексов, а также комплексов ЕВН с молекулами ДНК-моноинтеркаляторов.

Библиографический список использованной литературы

1. Brana M.F. Intercalators as anticancer drugs / M.F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* — 2001. — Vol. 7. — P. 1745–1780.
2. Gamage S.A. Structure-activity relationships for substituted bis(acridine-4-carboxamides): A new class of anticancer agents / S.A. Gamage, J.A. Spicer, G.J. Atwell [et al.] // *J. Med. Chem.* — 1999. — Vol. 42. — P. 2383–2393.
3. Brana M.F. Synthesis, cytotoxic activities and proposed mode of binding of a series of bis{[(9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carbonyl)-amino]alkyl} alkylamines / M.F. Brana, L. Casarrubios, G. Dominguez [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* — 2002. — Vol. 37. — P. 301–313.
4. Chaires J.B. Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic / J.B. Chaires, F. Leng, T. Przewloka [et al.] // *J. Med. Chem.* — 1997. — Vol. 40. — P. 261–266.
5. Veselkov A.N. ^1H NMR investigation of the self-association of ethidium homodimer and its complexation with propidium iodide in aqueous solution / A.N. Veselkov, M.P. Evstigneev, D.A. Veselkov [et al.] // *J. Mol. Struct.* — 2004. — Vol. 690. — P. 17–24.
6. Evstigneev M.P. ^1H NMR determination of the self-association of an acridine homodimer and its complexation with ethidium bromide in aqueous solution / M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, D.B. Davies // *J. Mol. Str.* — 2006. — Vol. 784. — P. 162–168.

Поступила в редакцию 09.09.2010 г.

Євстигнєєв М.П. Моделювання різних структурних форм молекул ДНК біс-інтеркаляторів

Методами молекулярної механіки проведено моделювання структур відкритої та закритої форм мономеру ДНК біс-інтеркалятора гомодимера етидію.

Ключові слова: ДНК біс-інтеркалятор, гомодимер етидію, внутрішньомолекулярна трансформація.

Evstigneev M.P. Modeling of various structural forms of the DNA bis-intercalator molecules

Modeling the structures of unfolded and folded forms of the monomer of the DNA bis-intercalator ethidium homodimer is performed by means of molecular mechanics.

Keywords: DNA bis-intercalator, ethidium homodimer, intramolecular transformation.