

УДК 577.32

ТЕРМОДИНАМИКА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТА НОЕCHST 33258 С ДВУСПИРАЛЬНОЙ ДНК

Костюков В.В.

Севастопольский национальный технический университет
e-mail: Viktor_Kostukov@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2010

Проведен расчет и анализ энергетических вкладов различных физических взаимодействий в полную энергию Гиббса связывания двуспиральной ДНК с препаратом Hoechst 33258. Установлено, что сравнительно небольшая величина полной энергии комплексообразования является суммой больших по модулю компонент, имеющих различные знаки. Изучены вклады ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей (меж- и внутримолекулярных) и с водным окружением. Показано, что, энергетически выгодными при комплексообразовании Hoechst с ДНК являются гидрофобный и ван-дер-ваальсовый вклады, а энтропийный компонент и потеря части водородных связей с водой при связывании оказываются неблагоприятными. При этом электростатический вклад незначительно дестабилизирует комплекс.

Ключевые слова: энергетические вклады, комплексообразование, ДНК, Hoechst 33258.

ВВЕДЕНИЕ

Среди биологически активных ароматических соединений (БАС) отдельную группу составляют препараты, образующие комплексы с двуспиральной ДНК путем укладки в ее малый желобок [1]. Их молекулы имеют серповидную форму, повторяющую форму малого желобка дуплекса ДНК, и донорные и акцепторные центры водородных связей, специфичные к АТ-трактам ДНК. Многие из «желобочников», например, нетропсин, блеомицин и дистамицин, проявляют антиопухолевую активность и широко используются в клинической практике для химиотерапии раковых заболеваний [2].

Для понимания физического механизма действия существующих препаратов и создания новых, более эффективных, необходимо детальное знание физических факторов, влияющих на процесс связывания БАС с ДНК, и их энергетических вкладов в термодинамику комплексообразования [3]. К основным из них, согласно [1,3] относятся: электростатические, ван-дер-ваальсовы, гидрофобные взаимодействия, водородные связи, энтропийные и полиэлектролитный вклады. Однако, поскольку указанные антиопухолевые препараты являются довольно сложными по своей структуре молекулами, термодинамический анализ указанных физических вкладов в полную энергию Гиббса ΔG_{total} реакции комплексообразования является весьма затруднительным [3]. Поэтому на начальном этапе такие исследования представляется целесообразным проводить на более простых «желобочниках»,

наиболее изученным из которых является препарат Hoechst 33258 (НТ) (рис. 1).

НТ является синтетическим препаратом, состоящим из двух бензимидазольных, а также фенольного и N-метилпиперазинового колец, в свободном состоянии молекулы лежащими почти в одной плоскости [4]. Однако N-метилпиперазиновое кольцо не является полностью плоским и имеет значительную конформационную подвижность [5]. В определенной мере это обусловлено тем, что азот N3 данного кольца имеет необычную для органических соединений sp^3 -гибридизацию вместо sp^2 [6]. Торсионные углы между кольцами НТ, согласно [7], обозначаются как $\zeta_1, \zeta_2, \zeta_3$ (см. рис. 1). Молекула НТ, как и другие «желобочники», имеет изогнутую «изоспиральную» (isohelical) форму, позволяющую ей укладываться в малый желобок ДНК без существенных конформационных изменений ее самой и дуплекса ДНК с образованием специфических к АТ-трактам водородных связей. Основными донорами Н-связей в молекуле НТ являются атомы N3, а также кислород ОН-группы фенольного и азот N⁺H-группы N-метилпиперазинового колец. В свою очередь, акцепторами Н-связей ДНК в малом желобке являются N3(A) и O2(T) [3]. НТ используется в лабораторной практике в качестве флуоресцентного маркера ДНК, при связывании с которой его светимость увеличивается и смещается в коротковолновую область: от $\lambda=510$ нм в свободном состоянии до $\lambda \approx 450$ нм в комплексе [8].

Ранее попытки разделения энергетических вкладов при комплексообразовании НТ с ДНК были осуществлены различными группами исследователей.

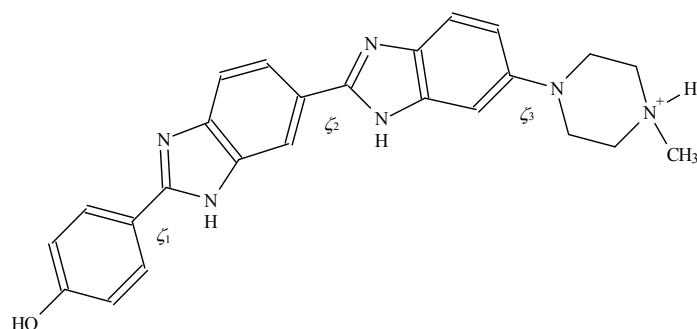


Рис. 1. Структурная формула препарата Hoechst 33258

В работе [9] процедура разделения основывается на утверждении, что водородные связи молекул ДНК и НТ с водой, теряемые частично при образовании комплекса, компенсируются образованием межмолекулярных Н-связей, так что суммарный вклад Н-связей в полную энергию связывания может быть принят равным нулю. Такой подход фактически равносильно исключению водородных связей из полной энергетики связывания, что не является корректным (см. более подробное обсуждение проблемы в работе [10]). Кроме этого, электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия также не анализируются в [9] в явном виде. Более детальное разделение энергетических вкладов в реакцию НТ-ДНК было выполнено в работе [3], но также без учета водородных связей. При этом расчетные величины полной энергии Гиббса оказались далекими от экспериментально наблюдаемой.

Таким образом, анализ литературы показывает, что задача разделения вкладов физических взаимодействий в комплексообразование препарата Hoechst 33258 с ДНК до сих пор не была решена. В настоящей работе методами молекулярного моделирования выполнен расчет энергетических вкладов различных физических факторов при комплексообразовании НТ с олигомером двуспиральной ДНК. Показано, что сумма независимо рассчитанных компонент свободной энергии Гиббса оказывается близкой к экспериментально наблюдаемой величине, что дает основание для определения стабилизирующих и дестабилизирующих комплекс физических факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Построение пространственной структуры комплекса.

Структура молекулы НТ (см. рис. 1), полученная в работах [11,12], взята из Protein Data Bank [13] (PDB ID 1Q5X). Атомные заряды НТ вычислены с помощью пакета Gaussian03W [14] методом Мерца-Коллмана на уровне теории MP2 с базисным набором 6-31G*. Топология молекулы лиганда и параметризация всех валентных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий получены с помощью пакета XPLO2D [15].

Поскольку НТ проявляет наибольшее сродство к АТ-сайтам ДНК с GC-парой на краю сайта [16], занимая 4 пары оснований при укладке в малый желобок [15], в качестве рецептора был выбран несомокомплементарный додекамер ДНК d(CGCA₄GCG)/(CGCT₄GCG). Пространственная структура дуплекса В-ДНК построена с помощью программы HyperChem 8.0 (Hypercube, Inc., Toronto, Canada). 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 [17]. Пространственная структура комплекса НТ-ДНК построена методом молекулярной механики с помощью программы X-PLOR, версия 3.1 [18].

Известно, что встраивание молекулы НТ в малый желобок дуплекса ДНК практически не изменяет его конформацию [4,19], но уменьшает угол пропеллера ω пар оснований ДНК [19,20] и расширяет примерно на 1 Å малый желобок ДНК N-метилпиперазиновым кольцом НТ [4,5]. В целом, литературные данные свидетельствуют о малых конформационных перестройках как НТ, так и ДНК при комплексообразовании (см. обзор [1]), что соответствует модели «ключ-замок», по сравнению, например, с интеркаляционным связыванием ароматических БАС с ДНК. В связи с этим, в настоящей работе комплекс строился из молекул НТ и В-ДНК, имеющих те же конформации, что и в свободном состоянии. Необходимые для стабильности комплекса малые конформационные изменения лиганда и ДНК реализовывались автоматически в процессе оптимизации геометрии системы.

Явное задание водного окружения производилось с помощью молекул воды модели TIP3P [21], размещенных в боксе, имеющем форму прямоугольного параллелепипеда с длинами ребер 54×30×30 Å (1663 молекулы). Нейтрализация зарядов фосфатов ДНК осуществлялась 22 ионами Na⁺, размещенными на расстояниях 6 Å от атомов фосфора на биссектрисах углов O1P-P-O2P [22].

Молекулярная динамика.

Расчет конформационной динамики НТ, ДНК и их комплекса в процессе теплового движения выполнен с помощью программы X-PLOR. Оптимизация геометрии комплекса НТ-ДНК осуществлялась путем минимизации потенциальной энергии методом

сопряженных градиентов. На первом этапе минимизации атомы растворенных веществ фиксировались, что позволяло ближайшим к ним молекулам воды релаксировать к равновесным положениям. Второй этап проводился без каких-либо ограничений на движение атомов системы.

После минимизации потенциальной энергии выполнялась процедура молекулярной динамики (МД) по алгоритму Verlet с временным шагом $\Delta t=2\text{фс}$ и использованием алгоритма SHAKE при постоянной температуре $T=298\text{ К}$. В процессе моделирования МД фиксировалась внешняя водная оболочка для препятствования выходу молекул воды в вакуум. Свободный (нефиксированный) водный слой соответствовал толщине ближней гидратной оболочки, т.е. бимолекулярному слою в $\approx 4\text{ \AA}$ [23]. Суммарное время эволюции составляло 2 нс. Координаты всех атомов записывались каждую 1 пс.

Расчет электростатического вклада.

Методика расчета электростатического вклада ΔG_{el} , основанная на решении нелинейного уравнения Пуассона-Больцмана (НУПБ), была достаточно подробно описана нами в работе [24]. Такой подход позволяет учесть изменение электрических свойств ближайшего гидратного слоя макромолекулы при связывании лиганда. В настоящей работе для решения НУПБ и вычисления ΔG_{el} использована программа DelPhi (версия 4.0) [25]. С помощью DelPhi вычислены составляющие полной электростатической энергии: энергия взаимодействия зарядов атомов растворенного вещества с индуцированными поверхностными зарядами на границе раздела с водой (энергия сольватации ΔG_{solv}) и энергия кулоновских взаимодействий между атомами растворенных веществ (энергия межмолекулярных взаимодействий ΔG_{im}).

$$\Delta G_{el} = \Delta G_{solv} + \Delta G_{im}. \quad (1)$$

Расчет ван-дер-ваальсового вклада.

Вычисление энергий межмолекулярных ван-дер-ваальсовых взаимодействий и с водным окружением проводилось методом молекулярной динамики при помощи программы X-PLOR с усреднением величин энергий за последние 40 пс МД. Параметризация ван-дер-ваальсовых взаимодействий соответствовала силовому полю AMBER.

Расчет энергии водородных связей.

Количество межмолекулярных водородных связей N_{im} определялось из расчетной структуры комплекса $N_{im}=3$, что соответствует литературным данным ($N_{im}=2\dots 4$, [1,4,7]). Средние количества молекул воды, формирующих водородные связи с гидрофильными атомами (N, O) молекул ДНК и лиганда (гидратационные индексы N_{solv}), рассчитывались по траекториям теплового движения в течение последних 40 пс молекулярной динамики. Наличие водородной связи фиксировалось, если расстояния между электроотрицательными атомами молекул и атомами кислорода (водорода) воды не превышали 3.2 (2.4) \AA , соответственно [26].

Методология расчета энергетики Н-связей между лигандом и ДНК и потери водородных связей с молекулами воды в процессе дегидратации лиганда и ДНК - ΔG_{HB} - была достаточно подробно описана ранее [10,27]. Ее суть состоит в том, что энергетика Н-связей частично ($\approx 75\%$) уже учитывается при расчете электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, поэтому вместо полного вклада Н-связей ΔG_{HB} следует использовать величину $\Delta \Delta G_{HB}=0.25 \cdot \Delta G_{HB}$. Кроме того, энтропийная составляющая Н-связи с водным окружением также неявно учитывается при расчете гидрофобного вклада ΔG_{hyd} (см. ниже), поэтому энергию образования Н-связи с водой можно считать равной среднему значению ее энтальпии: $\Delta H_{HBim}^0 = -9$ ккал/моль [28]. Энергетический вклад водородного связывания с водой, обусловленный дегидратацией НТ и малого желобка ДНК при образовании комплекса, оценивался по изменению среднего числа молекул воды, формирующих водородные связи с гидрофильными атомами растворенной молекулы (ΔN_{solv}) в процессе МД. Таким образом, энергетический вклад Н-связей $\Delta \Delta G_{HB}$, являющийся добавкой к (6) вместо ΔG_{HB} для корректировки полной энергии на водородное связывание, имеет вид [10,27]:

$$\Delta \Delta G_{HB} = 0.25 \cdot (-9) (N_{im} + \Delta N_{solv}) = -2.25 \cdot (N_{im} + \Delta N_{solv}), \text{ ккал/моль} \quad (2)$$

Расчет гидрофобного вклада.

Вычисление энергии гидрофобных взаимодействий при комплексообразовании НТ с ДНК в настоящей работе выполнено на основании известной корреляции энергии гидрофобного растворения ΔG_{hyd} и изменения площади поверхности, доступной растворителю (solvent-accessible surface area, SASA) ΔA [29]:

$$\Delta G_{hyd} = \gamma \cdot \Delta A, \quad (3)$$

где γ - микроскопический коэффициент поверхностного натяжения, $\gamma = 50$ кал/(моль $\cdot \text{\AA}^2$) [30]. SASA представляет собой площадь геометрического места центра пробной сферы с радиусом, равным ван-дер-ваальсовому радиусу молекулы воды (1.4 \AA), при ее движении по ван-дер-ваальсовой поверхности молекулы растворенного вещества или комплекса [31]. Расчет SASA проводился при помощи программы HyperChem 8.0.

Расчет энтропийного вклада.

Энтропийный фактор при комплексообразовании лиганда с ДНК обусловлен изменением общего числа трансляционных, ротационных и вибрационных степеней свободы: $\Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vibr}$. Компоненты ΔG_{tr} и ΔG_{rot} возникают благодаря потере трех трансляционных и трех ротационных движений при комплексообразовании. Компонент ΔG_{vibr} , является энергетическим эквивалентом изменения вибрации химических связей [32].

Свободная энергия Гиббса изменения трансляционных и ротационных степеней свободы может быть записана в стандартной форме:

$$\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T\Delta S_{tr}, \quad \Delta G_{rot} = \Delta H_{rot} - T\Delta S_{rot},$$

$$\text{где } \Delta H_{tr} = \Delta H_{rot} = -\frac{3}{2}RT \quad - \quad \text{энтальпийный}$$

эквивалент изменения трансляционных и ротационных степеней свободы, соответственно; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Выражения для молярных трансляционной, ротационной и вибрационной энтропий известны из классической статистической термодинамики [32]:

$$S_{tr} = R \left[\frac{5}{2} + \frac{3}{2} \ln \frac{2\pi mkT}{h^2} - \ln \frac{N}{V} \right],$$

$$S_{rot} = R \left[\frac{3}{2} + \frac{1}{2} \ln \pi I_x I_y I_z + \frac{3}{2} \ln \frac{8\pi^2 kT}{h^2} - \ln \sigma \right] \quad (4)$$

$$S_{vib} = \frac{1}{T} \sum_{j=1}^{3N-6} \frac{h\nu_j}{e^{h\nu_j/kT} - 1} - k \ln(1 - e^{-h\nu_j/kT}),$$

$$H_{vib} = \sum_{j=1}^{3N-6} \frac{h\nu_j}{e^{h\nu_j/kT} - 1} + \frac{h\nu_j}{2}, \quad (5)$$

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, равный единице для несимметричных комплексов; ν_j – нормальные моды колебаний, рассчитанные при помощи пакета Gaussian03W полуэмпирическим методом PM3; N – число атомов. Величины моментов инерции для молекулы НТ, 12-мера ДНК и их комплекса получены с помощью программы X-PLOR.

На основании выражений (4)-(5) могут быть рассчитаны изменения соответствующих термодинамических параметров при комплексообразовании лиганда (D) с дуплексом ДНК (N_2), как

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурная характеристика комплекса НТ-ДНК.

Расчетная пространственная структура комплекса НТ с ДНК показана на рис. 2.

Как упоминалось выше, в свободном состоянии все четыре кольца НТ примерно копланарны. Согласно экспериментальным данным работы [20], при связывании с ДНК торсионный угол ζ_1 остается малым ($\approx 8^\circ$), в то время как $\zeta_2 \approx 32^\circ$, а $\zeta_3 \approx 14^\circ$. Расчеты, выполненные в [5], показали, что наиболее подвижным в процессе МД является торсионный угол ζ_3 , величина которого изменялась приблизительно от -150° до 0° , в то время как ζ_1 и ζ_2 сохраняли начальные значения ($0 \pm 10^\circ$). В настоящей работе расчетные величины указанных углов, усредненные по МД, для НТ в свободном состоянии составили $\zeta_1 = (1 \pm 12)^\circ$, $\zeta_2 = (0 \pm 7)^\circ$, $\zeta_3 = (-108 \pm 28)^\circ$, а в составе комплекса с ДНК $\zeta_1 = (-1 \pm 12)^\circ$, $\zeta_2 = (-1 \pm 7)^\circ$, $\zeta_3 = (58 \pm 12)^\circ$. Таким образом, имеет место существенное изменение и уменьшение

подвижности только величины угла ζ_3 в молекуле НТ при ее укладке в малый желобок.

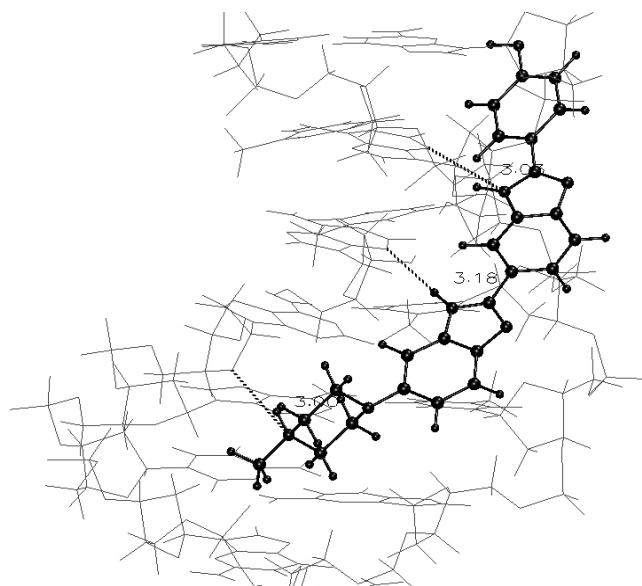


Рис. 2. Расчетная структура комплекса препарата Hoeschst 33258 с дуплексом ДНК. Межмолекулярные Н-связи показаны пунктиром

Другими словами, при связывании с ДНК значительно уменьшается подвижность N-метилпиперазинового кольца НТ, что согласуется с результатами работы [19]. Вероятно, это обусловлено образованием Н-связи между атомом N6(НТ) и O4⁺(A5). Кроме этого, в расчетной структуре комплекса обнаружены еще две межмолекулярные Н-связи: N1(НТ) – N3(A7) и N3(НТ) – N3(A6). Величины среднеквадратичных отклонений координат молекулы НТ в комплексе относительно свободного состояния составили 0.66 Å по «тяжелым» (неводородным) атомам и 1.16 Å – по всем атомам. Соответствующие значения для додекамера ДНК составили 0.69 Å и 0.75 Å. Следовательно, конформационные изменения лиганда и ДНК при связывании можно считать незначительными, как это было принято ранее в работе [9].

Общий подход к расчету составляющих суммарной энергии Гиббса реакции комплексообразования Hoeschst 33258 с ДНК.

Наиболее полное разделение вкладов было произведено нами ранее в работе [10] для класса ароматических интеркаляторов ДНК. Поскольку предложенная в этой работе методика дает хорошее совпадение расчетных и экспериментальных энергий Гиббса для различных по структуре и зарядовым состояниям лигандов, в настоящей работе нами был использован подход, аналогичный [10].

Энергетический анализ комплексообразования НТ с двуспиральной ДНК проводился на основании уравнения [10,27]

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{conf} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{el} + \Delta G_{pe} + \Delta \Delta G_{HB} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vibr}, \quad (6)$$

где ΔG_{conf} – вклад конформационных изменений в ДНК и лиганде (энергетический вклад конформационных изменений лиганда и ДНК при связывании может быть принят равным нулю $\Delta G_{\text{conf}} \approx 0$ [9]); ΔG_{vdw} – вклад ван-дер-ваальсовых взаимодействий; ΔG_{el} – электростатический вклад; ΔG_{pe} – полиэлектролитный вклад; $\Delta \Delta G_{\text{HB}}$ – добавочное значение энергии водородных связей (см. Материалы и методы); ΔG_{hyd} – гидрофобный вклад; ΔG_{tr} , ΔG_{rot} , ΔG_{vibr} –

энергетические эквиваленты изменения, соответственно, трансляционных, ротационных и вибрационных степеней свободы при комплексообразовании.

Анализ энергетического вклада ван-дер-ваальсовых взаимодействий ΔG_{VDW} .

Расчетные величины ван-дер-ваальсовых энергий (VDW) в комплексе НТ-ДНК представлены в табл. 1.

Таблица 1

Расчетные значения энергий ван-дер-ваальсовых взаимодействий (ккал/моль) при связывании препарата Ноеchst 33258 с 12-мером ДНК

С растворителем					Межмолекулярная	Полная
G_{HT}	$G_{\text{ДНК}}$	G_{HT^*}	$G_{\text{ДНК}^*}$	ΔG_{solv}	ΔG_{im}	ΔG_{vdw}
-56.5	-206	-21.8	-188	52.7	-64.1	-11.4

Примечание: здесь и далее знаком «*» обозначены параметры молекул в составе комплекса, а без него – в свободном состоянии

Из табл. 1 видно, что межмолекулярные ван-дер-ваальсовы взаимодействия являются энергетически выгодными ($\Delta G_{\text{im}} < 0$), т.е. стабилизируют комплекс НТ-ДНК, в то время как частичная потеря ван-дер-ваальсовых контактов молекул НТ и ДНК с водой оказывается неблагоприятной ($\Delta G_{\text{solv}} > 0$). Отметим, что такие закономерности в знаках ΔG_{im} и ΔG_{solv} имели место и ранее для интеркаляционного связывания БАС с ДНК [10,27].

Расчитанная величина ΔG_{im} хорошо согласуется со значениями -56.5 и -68.9 ккал/моль, полученными в работе [3] для сайтов связывания A_3T_3 и A_2T_2 , соответственно. При этом энергия межмолекулярных ван-дер-ваальсовых взаимодействий по абсолютной величине существенно превышает энергию взаимодействий с водным окружением, так что в целом ван-дер-ваальсовы взаимодействия стабилизируют комплекс энергией $\Delta G_{\text{vdw}} = -11.4$

ккал/моль. Отметим, что в работе [33] также обнаружены интенсивные ван-дер-ваальсовы взаимодействия молекулы НТ со «стенками» и «дном» малого желобка. Поэтому неучет в работе [9] ван-дер-ваальсовых взаимодействий, объясняемый их взаимной компенсацией с другими составляющими, не является корректным. Потере ван-дер-ваальсовых контактов молекулы НТ с водой соответствует более значительный энергетический вклад в ΔG_{solv} ($G_{\text{HT}^*} - G_{\text{HT}} = 34.7$ ккал/моль) по сравнению с ДНК ($G_{\text{DNA}^*} - G_{\text{DNA}} = 17.9$ ккал/моль), что обусловлено, вероятно, экранированием большего числа гидрофильных центров лиганда при связывании по сравнению с ДНК.

Анализ энергетического вклада электростатических взаимодействий ΔG_{el} .

Результаты вычислений электростатических энергий приведены в табл. 2.

Таблица 2

Расчетные значения энергий электростатических взаимодействий (ккал/моль) при связывании препарата Ноеchst 33258 с 12-мером ДНК

НТ		ДНК		Комплекс		ΔG_{solv}	ΔG_{im}	ΔG_{el}
G_{solv}	G_{im}	G_{solv}	G_{im}	G_{solv}	G_{im}			
-414	-208	-10764	-4006	-11037	-4354	140.6	-139.8	0.8

Как видно из табл. 2, энергии сольватационных ΔG_{solv} и кулоновских (межмолекулярных) ΔG_{im} взаимодействий имеют разные знаки и весьма близки между собой по абсолютной величине. Это обуславливает практически полную компенсацию энергий так, что полный вклад электростатики оказывается слабо дестабилизирующим комплекс. При этом значение сольватационной составляющей $\Delta G_{\text{solv}} > 0$, что обусловлено потерей энергетически выгодных контактов молекул НТ и ДНК с водой при их связывании, а межмолекулярные кулоновские взаимодействия в комплексе оказываются энергетически выгодными ($\Delta G_{\text{im}} < 0$). Это объясняется тем, что АТ-желобок имеет отрицательный

электростатический потенциал [33], а молекула НТ несет единичный положительный заряд. Полученные закономерности качественно соответствуют результатам других авторов [3] и полученным ранее результатам для интеркаляционного связывания лигандов с ДНК [10,27].

Полиэлектролитный вклад в энергию комплексообразования антибиотиков с ДНК ΔG_{pe} .

Полиэлектролитный вклад ΔG_{pe} содержит как энтальпийную составляющую, происходящую от кулоновского взаимодействия исследуемых молекул с ионами соли, так и энтропийную компоненту, обусловленную нарушением ионной атмосферы при интеркаляции лиганда. Составляющую ΔG_{pe}

целесообразно отделить от полной электростатической энергии, ΔG_{el} , поскольку она может быть сравнительно легко измерена экспериментально и составляет, согласно [9], $\Delta G_{pe} = -1.8$ ккал/моль. Как видно, полиэлектролитный вклад является весьма малым по сравнению с другими и способствует образованию комплекса. Эффект по

своей природе носит преимущественно энтропийный характер и обусловлен энтропийно выгодным высвобождением противоионов при связывании НТ с ДНК [9].

Анализ энергетического вклада водородных связей ΔG_{HB} .

Результаты расчетов представлены в табл. 3.

Таблица 3

Величины гидратационных индексов и энергетический вклад водородных связей (ккал/моль) при связывании препарата Hoechst 33258 с 12-мером ДНК

N				ΔN_{solv}	$\Delta \Delta G_{solv}$	$\Delta \Delta G_{im}$ ($N_{im}=3$)	$\Delta \Delta G_{HB}$
ДНК	НТ	ДНК*	НТ*				
164	7.9	153	4.4	-14.1	31.7	-6.8	25.0

Из анализа данных табл. 3 следует, что дуплекс ДНК при связывании с НТ теряет приблизительно 10 молекул воды ближайшей гидратной оболочки, а молекула НТ – около 4. Таким образом, имеет место высвобождение молекул воды при комплексобразовании, что согласуется с результатами предыдущих исследований [34,35]. В целом, согласно расчетам, при связывании НТ с ДНК происходит разрушение около 14 Н-связей с водой, вместо которых образуется лишь 3 межмолекулярные Н-связи, и энергетический вклад Н-связей оказывается весьма невыгодным. Данная закономерность имела

место ранее и для случая комплексобразования интеркаляторов с ДНК [10,27].

Анализ гидрофобного вклада ΔG_{hyd} .

В таблице 4 представлены результаты расчета SASA и гидрофобного вклада при комплексобразовании НТ с ДНК. Видно, что относительная разница между величинами A для НТ и НТ*, ДНК и ДНК* очень мала, что свидетельствует о несущественных изменениях конформаций самого лиганда и ДНК при связывании и подтверждает сделанное выше допущение о возможности неучета конформации.

Таблица 4

Площади поверхностей A молекул НТ и ДНК и их комплекса (Å^2) и соответствующий гидрофобный вклад ΔG_{hyd} (ккал/моль)

A					ΔA	ΔG_{hyd}
НТ	ДНК	НТ*	ДНК*	Комплекс		
731	4021	728	3980	3827	-925	-46.3

Как видно из табл. 1, гидрофобный вклад является энергетически выгодным и существенно стабилизирует комплекс. Стоит, однако отметить, что в работе [9] расчетный гидрофобный вклад для системы НТ-ДНК составил $\Delta G_{hyd} = -26.4$ ккал/моль, т.е. существенно отличное от того, что получено в настоящей работе. В [9] было использовано другое, чем (3) соотношение для расчета гидрофобного вклада: $\Delta G_{hyd} = 80 \Delta C_p$, которое, как было показано в [36], для систем Лиганд-ДНК не является корректным. При этом использованные в расчетах здесь и в [9] абсолютные значения SASA и ее изменения достаточно близки друг к другу и не могут повлиять на результат сравнения.

Отметим, что для НТ величина гидрофобного вклада в среднем оказывается существенно большей, чем для интеркаляторов ДНК приблизительно той же молекулярной массы ($\mu_{HT} = 425$ Да). Так, для новантрона NOV ($\mu_{NOV} = 444$ Да) ранее нами было получена величина $\Delta G_{hyd} = -25.2$ ккал/моль, и лишь ногаламицин NOG ($\mu_{HT} = 788$ Да) при связывании с ДНК дает такой же гидрофобный вклад $\Delta G_{hyd} = -46.0$ ккал/моль [36]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что вследствие принципиально иного типа связывания с ДНК «желобочник» НТ гораздо более интенсивно вытесняет воду гидратных оболочек при связывании с ДНК по сравнению с интеркаляторами.

Анализ энтропийного вклада ΔG_{entr} .

Результаты вычислений представлены в табл. 5.

Таблица 5

Энергетический вклад энтропийных составляющих (ккал/моль) при комплексобразовании препарата Hoechst 33258 с 12-мером ДНК

Трансляционные ΔG_{tr}			Ротационные ΔG_{rot}			Вибрационные ΔG_{vibr}			ΔG_{entr}
ΔG^0	ΔH^0	$-T\Delta S^0$	ΔG^0	ΔH^0	$-T\Delta S^0$	ΔG^0	ΔH^0	$-T\Delta S^0$	
10.3	-0.89	11.2	10.5	-0.89	11.4	-0.95	-0.86	-0.10	19.8

Как следует из табл. 5, составляющие ΔG_{tr} и ΔG_{rot} являются преимущественно энтропийными по своей природе ($T\Delta S > |\Delta H$) и дают неблагоприятный вклад в общую энергию комплексообразования. Такой результат является вполне ожидаемым, учитывая энтропийную невыгодность потери трех ротационных и трансляционных степеней свободы при связывании лиганда с ДНК. Данная закономерность проявляется и для связывания интеркаляторов с ДНК, причем ΔG_{tr} и ΔG_{rot} имеют примерно такие же значения (≈ 10 ккал/моль) [10,27], что объясняется слабой логарифмической зависимостью величин ΔG_{tr} и ΔG_{rot} от значений масс и моментов инерций лигандов (см. (4)). В работе [9] вклад потери трансляционных и ротационных степеней свободы принят $\Delta G_{tr} = 15$ ккал/моль. В то же время, вклад трансляционной и ротационной энтропий в [34] составил $\Delta G_{tr} = 2.4$ ккал/моль. При этом вибрационные компоненты в [9] и [34] не учитывались. Вибрационный вклад обусловлен появлением новых мод колебаний химических связей в молекуле НТ и является энтропийно выгодным $\Delta S_{vibr} > 0$ (см. табл. 5). Вклад

изменения вибраций химических связей для НТ оказывается существенно меньшим, чем для интеркаляторов, для которых он в среднем равен $\Delta G_{vibr} = -4.3$ ккал/моль [10,27].

Суммарный энтропийный вклад связывания НТ с ДНК составил $\Delta G_{entr} \approx 20$ ккал/моль, что хорошо согласуется со значениями 25.2 и 25.1 ккал/моль для участков A_3T_3 и A_2T_2 , соответственно [3]. Данная величина ΔG_{entr} вследствие малости отрицательного вклада ΔG_{vibr} оказывается примерно в два раза больше, чем для случая интеркаляторов [10,27]. В целом, сумма всех энтропийных составляющих $\Delta G_{entr} = \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vibr} > 0$ положительна и дестабилизирует комплекс НТ-ДНК.

Анализ суммарной энергии комплексообразования НТ-ДНК.

В табл. 6 представлены результаты расчетов разных энергетических вкладов, взятых из табл. 1-5, согласно уравнению (6), а также экспериментальная энергия Гиббса ΔG_{exp} комплексообразования лиганда с ДНК [9].

Таблица 6

Составляющие полной энергии связывания препарата Hoechst 33258 с ДНК (ккал/моль)

ΔG_{tr}	ΔG_{rot}	ΔG_{vibr}	$\Delta G_{el} = 0.76$		$\Delta G_{vdw} = -11.3$		$\Delta \Delta G_{HB} = 24.9$		ΔG_{hyd}	ΔG_{pe}	ΔG_{total}	ΔG_{exp} [9]
			ΔG_{solv}	ΔG_{im}	ΔG_{solv}	ΔG_{im}	ΔG_{solv}	ΔG_{im}				
10.3	10.5	-1.0	141	-140	52.7	-64.1	31.7	-6.75	-46.3	-1.8	-13.9	-11.7

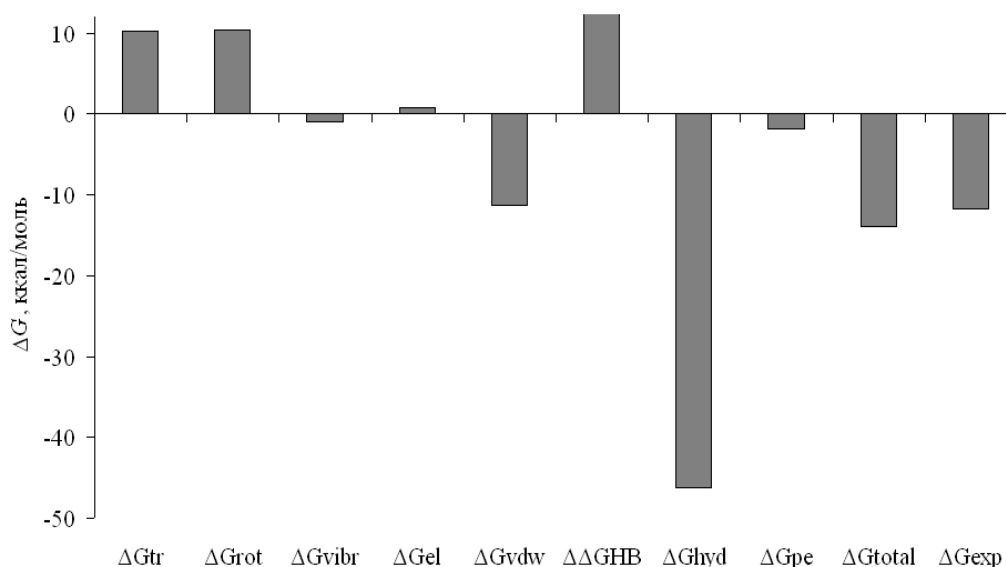


Рис. 3. Вклады различных составляющих в полную энергию Гиббса комплексообразования препарата Hoechst 33258 с ДНК

На рис. 3 в виде диаграммы представлены энергетические вклады различных видов физических взаимодействий.

Главным выводом из анализа таблицы 6 является хорошее совпадение суммы расчетных величин ΔG_{total} , вычисленных различными методами, с экспериментально измеренной в [9] полной энергией Гиббса ΔG_{exp} . Это свидетельствует, прежде всего, о корректности примененной методики расчета энергетических вкладов. Отметим, что в работе [19]

методом МД вычислено изменение конфигурационной энтропии, обусловленной снижением подвижности НТ при связывании с ДНК: $-T\Delta S_{config} = 25.5$ ккал/моль, при этом авторы пренебрегли вкладами трансляционной и вибрационной энтропий, считая их малыми. В работе [34] авторы, напротив, считают малой косвенно полученное ими положительное изменение конфигурационной энтропии ($-T\Delta S_{config} = -0.6$ ккал/моль). Поскольку в настоящей работе вклад ΔS_{config} не учитывался, и при

этом получено значение ΔG_{total} , близкое к ΔG_{exp} , по всей видимости, вклад конфигурационной энтропии в энергию связывания НТ с ДНК является незначительным. Из анализа данных таблицы 6 и рис. 3 можно сделать окончательные выводы о вкладе различных физических взаимодействий в стабилизацию комплекса НТ-ДНК. Основной движущей силой комплексообразования являются гидрофобные взаимодействия, что согласуется с выводами [9] и результатами, полученными ранее для интеркаляторов [10,27]. Также существенный вклад в стабилизацию комплекса вносят ван-дер-ваальсовы взаимодействия в целом. В то же время потеря части Н-связей с водой при комплексообразовании, а также потеря трансляционных и ротационных степеней свободы являются энергетически весьма невыгодными. Электростатические взаимодействия в целом, а также вибрационный и полиэлектролитный компоненты вносят незначительные вклады в полную энергию комплексообразования.

Основными отличиями при связывании НТ с ДНК от случая интеркаляторов (см. [10,27]) являются отсутствие этапа раскручивания ДНК и соответствующего невыгодного положительного энергетического вклада (энергии активации реакции комплексообразования), а также существенно больший гидрофобный вклад и меньший энтропийный. По всей видимости, значительно меньшая энергия активации реакции комплексообразования «желобочника» с ДНК по сравнению с интеркаляторами, соответствующая модели «ключ-замок», и более интенсивные гидрофобные взаимодействия и обуславливают его большее сродство к ДНК по сравнению с ароматическими БАС.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе впервые выполнен расчет и анализ энергетических вкладов различных физических взаимодействий в полную энергию Гиббса реакции комплексообразования препарата Hoechst 33258 с двухспиральной ДНК. Основной движущей силой связывания препарата с ДНК являются гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, в то время как гидратационный и энтропийный вклады являются энергетически невыгодными. Электростатический вклад незначительно дестабилизирует комплекс.

Литература

1. *Haq I.* Thermodynamics of Drug-DNA interactions // Arch. Biochem. Biophys. – 2002. – Vol.403. – P. 1-15.
2. *Yang X.-L., Wang A. H.-J.* Structural studies on atom-specific anticancer drugs acting on DNA // Pharmacol. Therap. – 1999. – Vol.83. – P.181-215.
3. *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. – Vol.429 – P. 81–99.
4. *Clark G.R., Squire C.J., Gray E.J., Leupin W., Neidle S.* Designer DNA-binding drugs: the crystal structure of a meta-hydroxy analogue of Hoechst 33258 bound to $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol.24. – P. 4882-4889.
5. *Wellenzohn B., Flader W., Winger R.H., Hallbrucker A., Mayer E., Liedl K.R.* Significance of Ligand Tails for Interaction with the Minor Groove of B-DNA // Biophys. J.–2001.–Vol.81. – P. 1588–1599.
6. *Cheatham T. E., Cieplak P., Kollman P. A.* A modified version of the MD et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1999. –Vol.16. – P. 845-862.
7. *Quintana J.R., Lipanov A.A., Dickerson R.E.* Low-temperature crystallographic analyses of the binding of Hoechst 33258 to the doublehelical DNA dodecamer CGCGAATTCGCG // Biochemistry. – 1991. –Vol.30. – P. 10294-10306.
8. *Pal S.K., Zhao L., Zewail A.H.* Water at DNA surfaces: ultrafast dynamics in minor groove recognition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2003. – Vol.100.– P. 8113-8118.
9. *Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B.* Specific binding of Hoechst 33258 to the $d(\text{CGCAAATTTGCG})_2$ duplex: calorimetric and spectroscopic studies // J. Mol. Biol. – 1997. – Vol.271. – P. 244-257.
10. *Kostjukov V.V., Khomytova N.M., Evstigneev M. P.* // Partition of Thermodynamic Energies of Drug–DNA Complexation // Biopolymers.– 2009.–Vol. 91.–P. 773–790.
11. *Vega M.C., Garcia-Saez I, Aymami J., Eritja R., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Coll M.* Three-dimensional crystal structure of the A-tract DNA dodecamer $d(\text{CGCAAATTTGCG})$ complexed with the minor-groove-binding drug Hoechst 33258 // Eur. J. Biochem. – 1994. – Vol.222. – P. 721-726.
12. *Sriram M., van der Marel G.A., Roelen H.L.P.F., van Boom J. H., Wang A. H.-J.* Conformation of B-DNA Containing O6-ethyl-G_C base pairs stabilized by minor groove binding drugs: molecular structure of $d(\text{CGCGAATTCGCG})$ complexed with Hoechst 33258 or Hoechst 33342. // EMBO J. – 1992. – N 11. – P. 225-232.
13. *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. – Vol. 28. – P. 235-242.
14. Gaussian, Inc., 2004. Gaussian 03. Gaussian, Wallingford, CT.
15. *Kleywegt G.J.* Dictionaries for heteros // News from Uppsala Software Factory - 1998. – N 5. – P. 4.
16. *Pjura P. E., Grzeskowiak K., Dickerson R.E.* Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA // J. Mol. Biol. – 1987. – Vol.197. – P. 257-271.
17. *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.
18. *Brunger A.T.* X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR. - Yale: Univ. Press, 1992. - 382 p.
19. *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. – Vol.123. – P. 12658-12663.
20. *Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H.J.* The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the

- DNA dodecamer // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – Vol.16. – P. 2671–2690.
21. *Jorgensen W., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R., Klein M.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* - 1983. - Vol. 79. - P. 926-935.
 22. *Reddy S.Y., Leclerc F., Karplus M.* DNA Polymorphism: A Comparison of Force Fields for Nucleic Acids // *Biophys. J.*– 2003. – Vol. 84. – P. 1421–1449.
 23. *Chalikian T.V., Sarvazyan A.P., Breslauer K.J.* Hydration and partial compressibility of biological compounds // *Biophys. Chem.* - 1994. - Vol. 51. - P. 89-109.
 24. *Kostjukov V.V., Khomytova N.M., Davies D.B., Evstigneev M.P.* Electrostatic contribution to the energy of binding of aromatic ligands with DNA // *Biopolymers.* – 2008. – Vol. 89. – P. 680-690.
 25. *Rocchia W., Alexov E., Honig B.* Extending the applicability of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation: Multiple dielectric constants and multivalent ions // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – Vol.105. – P. 6507–6514.
 26. *Teplukhin A.V., Poltev V.I., Chuprina V.P.* Dependence of the hydration shell structure in the minor groove of the DNA double helix on the groove width as revealed by Monte Carlo simulation // *Biopolymers.* - 1991. - Vol.31. - P. 1445-1453.
 27. *Костюков В.В., Холутова Н.М., Евстигнеев М.П.* Энергетика комплексообразования ароматических антибиотиков с ДНК // *Физика живого.* – 2008. – Т. 16. – С. 5-14.
 28. *Makhatadze G.I., Privalov P.L.* Energetics of protein structure // *Adv. Protein Chem.* - 1995. -Vol.47. - P. 307-425.
 29. *Lazaridis T., Paulaitis M.E.* Entropy of hydrophobic hydration: a new statistical mechanical formulation // *J. Phys. Chem.* – 1992. – Vol.96. – P. 3847-3855.
 30. *Sharp K.A., Nicholls A., Fine R.F., Honig B.* Reconciling the magnitude of the microscopic and macroscopic hydrophobic effects // *Science.* – 1991. – Vol.252. – P. 106-109.
 31. *Lee B., Richards F.M.* The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility // *J. Mol. Biol.* - 1971. - Vol.55. - P. 379-400.
 32. *Noskov S.Yu., Lim C.* Free energy decomposition of protein-protein interactions // *Biophys. J.* - 2001. - Vol.81. - P. 737-750.
 33. *Clark G.R., Boykin D.W., Dzarny A., Neidle S.* Structure of a bis-amidinium derivative of Hoechst 33258 complexed to dodecanucleotide d(CGCGAATTCGCG)₂: the role of hydrogen bonding in minor groove drug-DNA recognition // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – Vol.25. – P. 1510–1515.
 34. *Han F., Taulier N., Chalikian T.V.* Association of the Minor Groove Binding Drug Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)₂: Volumetric, Calorimetric, and Spectroscopic Characterizations // *Biochemistry.* – 2005. – Vol.44. – P. 9785-9794.
 35. *Edwards K.J., Brown D.G., Spink N., Skelly J.V., Neidle S.* Molecular structure of the B-DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)₂. An examination of propeller twist and minor-groove water Structure at 2.2 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol.226. – P. 1161–1173.

ТЕРМОДИНАМІКА КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ПРЕПАРАТУ НОЕЧСТ 33258 З ДВОСПІРАЛЬНОЮ ДНК

Костюков В.В.

Проведено розрахунок і аналіз енергетичних внесків різних фізичних взаємодій у повну енергію Гіббса зв'язування двоспіральної ДНК з Hoechst 33258. Встановлено, що порівняно невелика величина повної енергії комплексоутворення є сумою великих за модулем компонент, що мають різні знаки. Вивчено вклади ван-дер-ваальсових взаємодій і водневих зв'язків (між-і внутрішньомолекулярних) і з водним оточенням. Показано, що, енергетично вигідними при комплексоутворенні Hoechst з ДНК є гідрофобний і ван-дер-ваальсових вклади, а ентропійний компонент і втрата частини водневих зв'язків з водою при зв'язуванні виявляються несприятливими. При цьому електростатичний внесок незначно дестабілізує комплекс.

Ключові слова: енергетичні вклади, комплексоутворення, ДНК, Hoechst 33258.

THE THERMODYNAMICS OF LIGANDING OF THE HOECHST 33258 WITH HELICAL DNA

Kostyukov V.V.

The calculation and analysis of energy contributions of various physical interactions in the total Gibbs energy of binding of double-stranded DNA with the drug Hoechst 33258. It is established that a relatively small quantity of the total energy of complexation is the sum of large modulus components with different signs. The contributions of van der Waals interactions and hydrogen bonds (the inter- and intramolecular) and with the aqueous environment was studied. It is shown that, energetically for complex formation with Hoechst DNA are hydrophobic and van der Waals contributions, and the entropy component and the loss of hydrogen bonds with water in the binding adversely. In this case, the electrostatic contribution slightly destabilizes the complex.

Key words: energy contributions, the complexation, DNA, Hoechst 33258.