

## Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 23. Комп'ютерне моделювання «напівінтеркаляційної» взаємодії монометинових ціанінових барвників з GCTA:TAGC-фрагментом ДНК

С. С. Лукашов, Г. О. Качковський<sup>1</sup>, С. М. Ярмолюк, Г. Х. Мацука

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна  
E-mail: otava@carriger.kiev.ua

<sup>1</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 62, Київ, 01033, Україна

---

*Проведено комп'ютерне моделювання ДНК-комплексів шести пірилієвих і піридинових монометинових ціанінових барвників з використанням методів MM+, AMBER, PM3 і CNDO/2 з пакету програм Nucleus 5.0. Комплекси у відповідності з раніше отриманими нами експериментальними даними побудовано згідно з моделлю «напівінтеркаляції» так, що інтеркалювало лише бензотіазолове ядро. Після оптимізації геометрії така структура комплексів зберігається. Для барвників у вільному стані і в комплексах розраховано розподіл заряду для основного ( $S_0$ ) і збудженого ( $S_1$ ) станів та визначено потенціальні енергії повертання гетерозалишків навколо зв'язків метинової групи. Величина енергії комплексів корелює із значеннями інтенсивностей флуоресценції барвників у присутності ДНК. Електронна густина на інтеркалюючому ядрі при утворенні комплексів зростає для всіх барвників, окрім Суап 40. Це протирічить її реальному перерозподілу, який проявляється, зокрема, в змінах стоксових зсувів. Значення потенціальних енергій обертання вказують на те, що при утворенні ДНК-комплексів жорсткість фіксації планарної конформації молекули барвника значно збільшується.*

---

Вступ. Протягом останнього десятиріччя флуоресцентні зонди на основі ціанінових барвників широко застосовують для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот (НК) [1]. Проте більшість комерційно доступних зондів побудована на основі лише кількох флюорофорів, структурно подібних до тіазолового оранжевого [1, 2]. Отже, пошук нових перспективних флюорофорів для створення на їхній основі високочутливих флуоресцентних зондів залишається актуальним завданням [3]. Оскільки хімічний синтез барвників, як правило, є досить трудомісткою процедурою, корисним був би попередній розрахунок їхніх спектральних властивостей за допомогою математичного моделювання.

У попередній роботі [4] було вивчено спектрально-люмінесцентні характеристики низки нових пірилієвих та піридинових монометинових ціанінових барвників та їхніх комплексів з НК. Для пояснення одержаних експериментальних даних було використано модель «напівінтеркаляції», згідно з якою бензотіазольне ядро барвників інтеркалює між парами основ, а інше зміщене до малої борозенки [5].

В даній роботі проведено комп'ютерне моделювання «напівінтеркаляційної» взаємодії шести отриманих барвників з GCTA:TAGC-фрагментом ДНК. Розраховано геометрію комплексів барвників з GCTA:TAGC; розподіл заряду в молекулах барвників в основному і збудженому станах у випадку вільних та зв'язаних з модельним фрагментом ДНК барвників; а також потенціальні енергії по-

© С. С. ЛУКАШОВ, Г. О. КАЧКОВСЬКИЙ, С. М. ЯРМОЛЮК, Г. Х. МАЦУКА, 2001

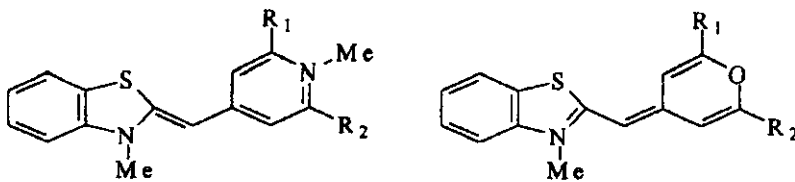
Cyan 40:  $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ Cyan 39:  $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ Snph:  $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$ Soph:  $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$ Sndph:  $R_1 = R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$ Sodph:  $R_1 = R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$ 

Рис. 1. Структурні формули досліджених барвників

вертання гетероциклічних залишків навколо зв'язків метиної групи для вільних та інтеркальованих барвників.

Методи розрахунків. У роботі досліджували барвники, зображені на рис. 1. Розрахунки проводили в наближенні молекулярної механіки (методи MM+ і AMBER) та квантово-хімічних методів PM3 і CNDO/2, реалізованих у пакеті програм Hyperchem 5.0. Структури барвників оптимізували в рамках методу PM3, заряди на барвниках вираховували методом CNDO/2. Для моделювання взаємодії з барвниками обрано чотирьохнуклеотидний фрагмент GCTA:TAGC В-форми дволанцюгової ДНК [6], що будувався автоматично з використанням нуклеотидів бази даних програми без додаткової оптимізації геометрії. Вихідною структурою комплексу для оптимізації геометрії слугувала така, в якій барвник був інтеркальований бензотіазольним ядром у ділянку ДНК СТ:AG з боку малої борозенки. Розрахунки комплексу ДНК з барвником здійснювали шляхом почергової оптимізації спочатку ДНК методом AMBER, а потім барвника методом PM3. Енергію утворення комплексу визначали як різницю обчислених методом MM+ енергій оптимізованого вільного барвника та енергії оптимізованого вільного барвника. Величину потенціальної енергії обертання гетерозалишків навколо зв'язків метиної групи розраховували як різницю енергій рівноважної конформації ( $E_{\text{ривн}}$ ) та конформації, утвореної при повороті гетероциклу навколо відповідного зв'язку на відповідний кут ( $E_{\text{пов}}$ ):  $\Delta E = E_{\text{пов}} - E_{\text{ривн}}$ .

Заряди на молекулах барвників у збудженому стані визначали при рівноважній геометрії основного стану. При побудові функції збудженого стану методом конфігураційної взаємодії використовували 16 найнижчих одноразово збуджених конфігурацій.

Результати і обговорення. Оптимізація геометрії ДНК-комплексів барвників. Вихідні комплекси побудовано відповідно до «напівінтеркаляційної» моделі так, що молекула барвника інтеркалювала в ДНК лише бензотіазольним ядром (рис. 2).

Таке розташування барвників зберігалось після проведення оптимізації геометрії комплексу, що підтверджує «напівінтеркаляційну» модель взаємодії досліджуваних барвників з ДНК. Розраховані значення енергій утворення ДНК-комплексів барвників наведено в табл. 1.

Згідно з розрахунками, комплекси пірилієвих барвників дещо стійкіші за комплекси піридинових. Введення до піридинового чи пірилієвого кільця барвника об'ємних фенільних груп послідовно зменшує стабільність ДНК-комплексу. Як видно з даних табл. 2, інтенсивність флюоресценції ДНК-комплексів піридинових барвників  $I_{\text{DNA}}$  зменшується в тій же послідовності [4].

Заряди на інтеркалюючому ядрі барвників. Електростатична взаємодія робить суттєвий внесок в утворення комплексів ціанінових барвників з ДНК. Вона значною мірою впливає на будову комплексів, а утворення комплексів позначається на розподілі електронної густини в молекулах барвників. Переріз подвійної спіралі ДНК являє собою електронно неоднорідне середовище: основи загалом нейтральні, а на цукрово-фосфатному остові містяться від'ємно заряджені фосфатні іони. Для «напівінтеркалюючої» молекули барвника результатом взаємодії з таким дипольним середовищем має бути зміщення електронної густини на інтеркалюючий гетерозалишок. Це підтверджує збільшення при взаємодії з ДНК стоксових зсувів для піридинових барвників ( $\Delta S_{\text{DNA}} - \Delta S_0 > 0$ ) і зменшення для пірилієвих ( $\Delta S_{\text{DNA}} - \Delta S_0 < 0$ ), що спостерігалось експериментально (табл. 2) [4].

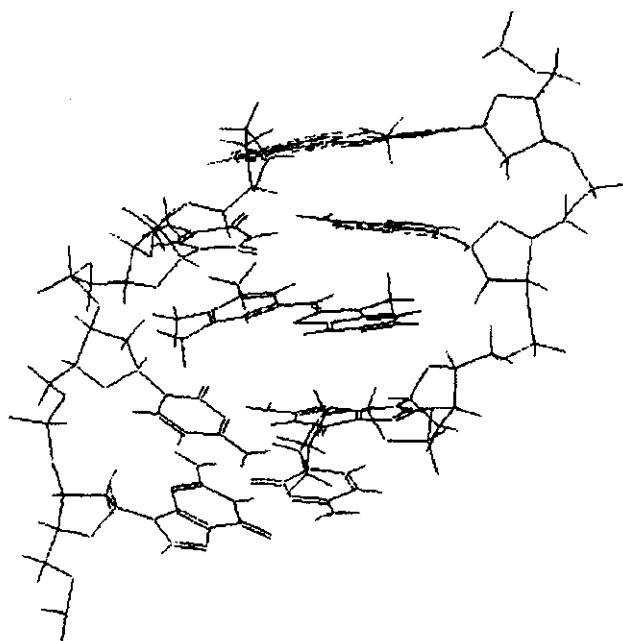


Рис. 2. Структура комплексу барвника Суап 40 з GCTA:TAGC-фрагментом ДНК. Бензотіазольне ядро інтеркалює між парами основ, а піридинове — знаходиться в малій борозенці

Для дослідження впливу «напівінтеркаляції» на розподіл електронної густини в молекулах барвників було розраховано сумарний заряд на інтеркалюючому бензотіазольному ядрі барвників у вільному стані і в ДНК-комплексах для основного ( $S_0$ ) та збудженого ( $S_1$ ) станів. Результати наведено в табл. 1 і на рис. 3.

Таблиця 1

Енергії ДНК-комплексів барвників (розраховані методом  $MM^+$ ) та сумарний заряд в основному ( $S_0$ ) і першому збудженому ( $S_1$ ) електронних станах (розраховані методом  $CNDO/2$ ) на бензотіазольному ядрі для інтеркальованих та вільних барвників

Барвник	Енергія ДНК-комплексу, кДж/моль	Заряд на бензотіазольному ядрі,  e			
		Інтеркальований барвник		Вільний барвник	
		$S_0$	$S_1$	$S_0$	$S_1$
Суап 40	-331,65	0,102	0,699	0,140	0,717
Saph	-298,64	0,153	0,736	0,120	0,707
Sndph	-183,90	0,147	0,731	0,108	0,706
Суап 39	-337,67	0,285	0,797	0,249	0,763
Soph	-315,82	0,250	0,772	0,214	0,753
Sodph	-290,53	0,221	0,790	0,185	0,763

Позитивний заряд на бензотіазольному ядрі в пірилієвих барвниках більший, ніж в піридинових. Це обумовлено меншою електронодонорністю пірилієвого залишку порівняно з піридиновим.

Як показують розрахунки, заміна метильних груп у пірилієвому та піридиновому кільцях на фенільні призводить до відтягування заряду з бензотіазольного ядра, тобто фенільні групи виступають донорами електронної густини. В піридинових барвниках при введенні фенільних груп заряд на бензотіазольному ядрі зменшується для вільних барвників і збільшується для барвників у комплексах. У збудженому стані донорний вплив другого ядра зменшується. Як наслідок, дія введення фенільних груп нівелюється.

Як було зазначено, при «напівінтеркаляційній» взаємодії барвника з ДНК електронна густина повинна зміщуватися на інтеркалююче ядро, тобто заряд там має зменшуватися. Однак очікуване зменшення заряду при утворенні ДНК-комплексу було отримане лише у випадку барвника Суап 40 (табл. 1, рис. 3). Для решти барвників заряд на бензотіазольному ядрі в ДНК-комплексі зростає. Ймовірно, що обраний метод розрахунку зарядів  $CNDO/2$  не зовсім придатний для розв'язання поставленої задачі, оскільки розраховані зміни електронної густини не відповідають змінам девіації, які спостерігаються для досліджених барвників при зв'язуванні з ДНК (табл. 1, рис. 3) [4].

Потенціальні енергії повертання гетерозалишків навколо зв'язків метинової групи. Відомо, що основною причиною значного зростання інтенсивності флюоресценції ціанінових барвників при взаємодії з ДНК є фіксація плоскої конформації молекули барвника [7]. Для оцінки жорсткості

Таблиця 2

Значення довжин хвиль максимумів спектрів поглинання ( $\lambda^{ab}$ ) та флюоресценції ( $\lambda^f$ ), коефіцієнта молярної екстинкції ( $\epsilon$ ), стоксового зсуву ( $\Delta S$ ), інтенсивності флюоресценції  $I$  та відношення  $I_{DNA}/I_0$  для розглянутих у даній роботі ціанінових барвників у водному трис-НСІ буфері, рН 7,5 (індекс 0), у ДМФА та в присутності ДНК [4]

Параметр	Суап 40	Snph	Sndph	Суап 39	Soph	Sodph
$\lambda_0^{ab}$ , нм	435	446	459	435; 457	458 (483)	469 (508)
$\lambda_{DMFA}^{ab}$ , нм	440	452	463	439; 461	464; 486	481; 508
$\lambda_{DNA}^{ab}$ , нм	439	448	459	(433) 457	467 (495)	487; 521
$\epsilon_0 \cdot 10^3, M^{-1}cm^{-1}$	54	86	76	47; 55	49 (43)	33 (22)
$\epsilon_{DMFA} \cdot 10^3, M^{-1}cm^{-1}$	59	96	86	48; 55	52; 48	45; 41,5
$\epsilon_{DNA} \cdot 10^3, M^{-1}cm^{-1}$	47	78	73	(40) 48,5	42 (30)	31,5; 27
$\lambda_0^f$ , нм	474	500	520	500	540	615
$\lambda_{DMFA}^f$ , нм	478	500	520	495	540	535; 570
$\lambda_{DNA}^f$ , нм	479	508	532	490	523; 553	547; 580
$\Delta S_0$ , нм	39	54	61	43	82	146
$\Delta S_{DMFA}$ , нм	38	48	57	34	76	89; 27
$\Delta S_{DNA}$ , нм	40	60	73	33	56	93; 26
$I_0$ , відн. од.	0,174	0,19	0,17	0,03	0,028	0,044
$I_{DMFA}$ , відн. од.	0,25	0,26	0,26	0,038	0,047	0,04; 0,044
$I_{DNA}$ , відн. од.	44,8	13,6	4,3	0,3	0,5	0,247; 0,24
$I_{DNA}/I_0$	257	71,6	25,3	10	17,9	5,6

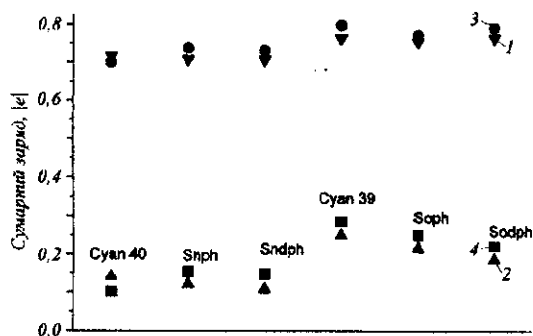


Рис. 3. Сумарний заряд (в одиницях заряду електрона) на інтеркалюючому бензотіазольному ядрі барвника у вільному стані (1, 2) і в комплексі з ДНК (3, 4) в основному (2, 4) та збудженому (1, 3) станах

фіксації розраховано енергії повертання обох гетероциклічних ядер барвника навколо зв'язків метинової групи у вільному стані і в ДНК-комплексі. Результати представлено на рис. 4. В результаті зв'язування з ДНК, як і слід було очікувати, молекула барвника жорстко фіксується — енергія молекули помітно зростає і перевищує значення  $kT$  (0,6 ккал/моль за кімнатної температури) вже при

поворотах навколо зв'язків метинової групи на кути до  $5^\circ$  (рис. 4). В той же час для вільного барвника можливим є вільне взаємне повертання гетероциклів на значно більші кути.

Заміна метильних груп фенільними в пірилієвому та піридиновому кільцях веде до сильного звужування областей, окреслених кривими на рис. 4, тобто до посилення фіксації молекули барвника. При цьому інтенсивність флюоресценції ДНК-комплексів, навпаки, зменшується в рядах Суап 40 > Snph > Sndph і Soph > Суап 39 > Sodph (табл. 2). Це можна пояснити зменшенням у цих же рядах стабільності комплексів (табл. 1) і збільшенням схильності барвників до асоціації у водному розчині ( $\epsilon_0 < \epsilon_{DMFA}$ , табл. 2) [8]. Обидва явища ведуть до зменшення ймовірності знаходження барвника в складі флюоресцентного ДНК-комплексу і, отже, до зменшення інтенсивності випромінювання.

Для пірилієвих барвників Суап 39, Sodph і для піридинових Snph та Sndph, як видно з рис. 4, в ДНК-комплексах фіксується неплоска конформація. Це може бути однією з причин того, що інтенсивність флюоресценції  $I_{DNA}$  барвників Суап 39 та Sodph у присутності ДНК є нижчою за  $I_{DNA}$  барвника Soph, а  $I_{DNA}$  барвників Snph та Sndph — ніж  $I_{DNA}$  Суап 40 (табл. 2). Таким чином, зміна  $I_{DNA}$

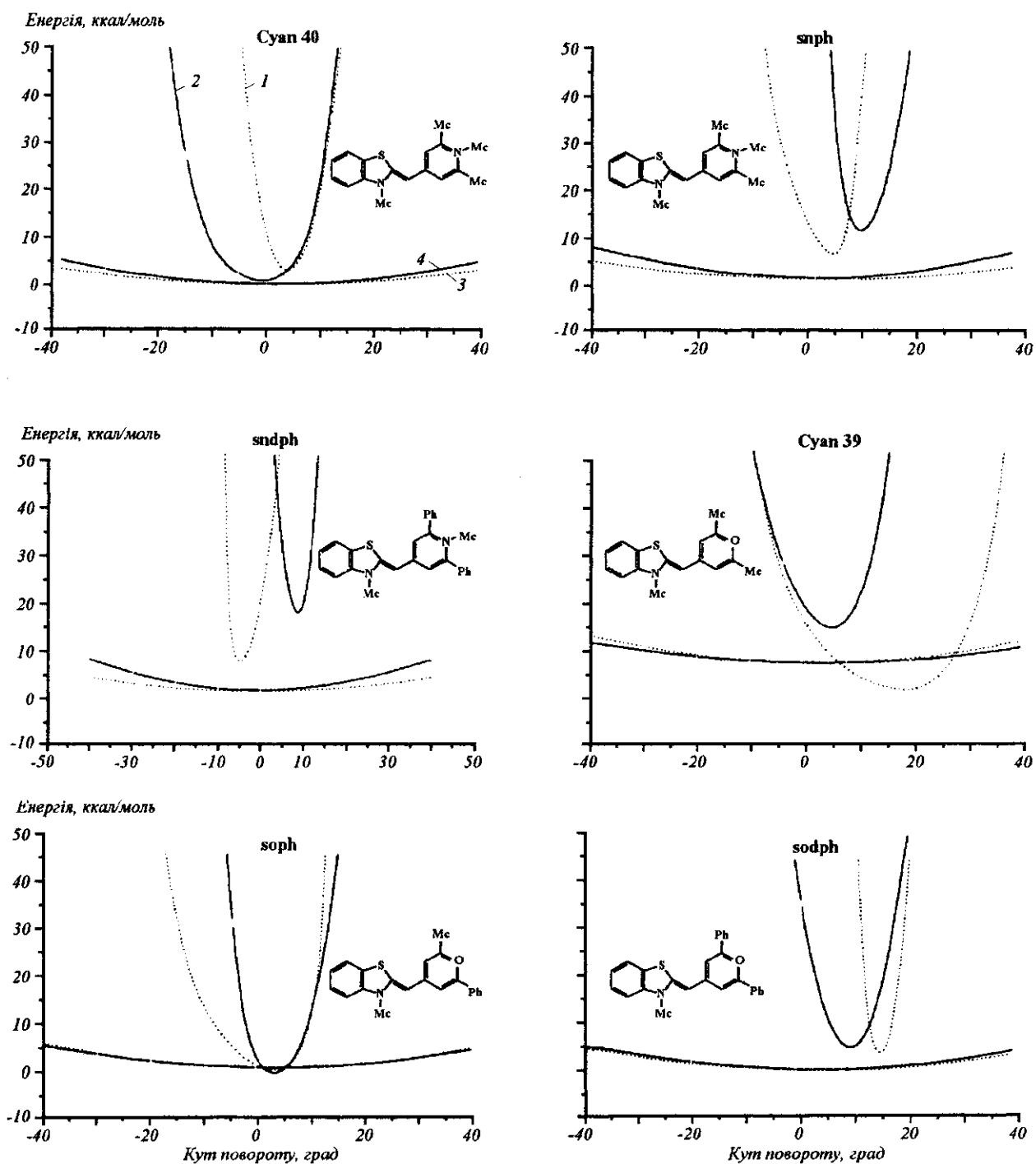


Рис. 4. Потенціальні енергії повертання бензотіазолового (1) та пірилієвого/піридинового (2) гетероциклічних ядер навколо зв'язку метинової групи для вільних барвників (3) та їхніх ДНК-комплексів (4), розраховані методом ММ+

барвників всередині пірилієвого та піридинового рядів внаслідок заміщення метильних груп на фенільні може бути зумовлена різним взаємним розташуванням гетероциклів у різних барвників одного ряду при зв'язуванні з ДНК.

**Висновки.** Розраховані значення енергій утворення ДНК-комплексів досліджених барвників загалом узгоджуються з експериментальними величинами інтенсивностей флюоресценції цих барвників у присутності ДНК. Обчислені зміни розподілу заряду в молекулах барвників при утворенні ДНК-комплексів різняться з дослідними даними щодо зміни стоксових зсувів. Величини бар'єрів обертання гетероциклічних залишків навколо зв'язків метинової групи не точно корелюють із значеннями інтенсивності випромінювання.

Таким чином, застосоване для моделювання наближення молекулярної механіки є занадто неточним для передбачення спектральних властивостей ДНК-комплексів ціанінових барвників. Проте представлені розрахунки можуть бути застосовані як доповнення до загальної оцінки геометрії, енергії та динаміки ДНК-комплексів барвників та інших малих молекул.

Роботу виконано згідно з угодою про матеріальну підтримку № В507077 за програмою IPP Міністерства Енергетики США між Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (Київ) та Ліверморською національною лабораторією Каліфорнійського університету (Лівермор, Каліфорнія, США).

Автори висловлюють щире подяку М. Ю. Лоцицькому за критичні зауваження під час написання статті.

S. S. Lukashov, G. O. Kachkovsky, S. M. Yarmoluk, G. Kh. Matsuka

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 23. Computer simulation of «half-intercalative» interaction of monomethyne cyanine dyes with DNA

#### Summary

Computer simulation of interaction with DNA of six monomethyne cyanine dyes was carried out using MM+, AMBER, PM3 and CNDO/2 methods from Hyperchem 5.0 program packet. Geometry optimization of complexes was carried out, charge density for ground  $S_0$  and excited  $S_1$  states and potential energies of heterocycles' rotation around the bonds of methyne group for unbound dyes and dyes in complexes with DNA were calculated. Obtained energies of complexes are in agreement with observed fluorescent intensities of dyes in presence of DNA. Calculated electron density distribution changes in dyes' molecules upon DNA binding diverge with observed Stocks' shift values changes. Rotation potential energy values show that rigidity of fixation of dye's molecule planar conformation increases strongly upon binding to DNA.

С. С. Лукашов, Г. А. Качковский, С. Н. Ярмолюк, Г. Х. Мацука

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 23. Компьютерное моделирование «полуинтеркаляционного» взаимодействия монометиновых цианиновых красителей с ДНК

#### Резюме

Для шести пирилиевых и пиридиновых монометиновых цианиновых красителей осуществлено компьютерное моделирование ДНК-комплексов с использованием методов MM+, AMBER, PM3 и CNDO/2 пакета программ Hyperchem 5.0. Оптимизирована геометрия комплексов, для красителей в свободном состоянии и в комплексах рассчитано распределение заряда для основного ( $S_0$ ) и возбужденного ( $S_1$ ) состояний, а также потенциальные энергии вращения гетероостатков вокруг связей метиновой группы. Полученная величина энергии образования комплексов коррелирует со значениями интенсивности флюоресценции красителей в присутствии ДНК. Рассчитанные изменения распределения электронной плотности в молекулах красителей при образовании комплексов с ДНК расходятся с наблюдаемыми изменениями стоксовых сдвигов. Значения потенциальных энергий вращения указывают на то, что при образовании ДНК-комплекса жесткость фиксации молекулы красителя значительно возрастает.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals / Sixth ed.—Eugene: OR, 1996.—680 p.
- Deligeorgiev T. G. Molecular probes based on cyanine dyes for nucleic acid research // Near-infrared dyes for high technology applications. NATO ASI Series / Eds S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis.—Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. publ., 1998.—P. 125—139.
- Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Slominskii Y. L. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XII.  $\beta$ -substituted carbocyanines as possible fluorescent probes for nucleic acids detection // Bioorg. and Med. Chem. Lett.—2000.—9, N 12.—P. 1677—1678.
- Лукашов С. С., Качковский Г. О., Лоцицкий М. Ю., Ярмолюк С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 22. Спектрально-люмінесцентні властивості монометинових пірилієвих і піридинієвих ціанінів та їхніх комплексів з ДНК // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 3.—С. 242—252.
- Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Kovtun Y. P. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. V. Towards model of «half-intercalation» of monomethyne cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // Біополімери і клітина.—1999.—15, № 1.—P. 75—82.
- Jacobsen J. P., Pedersen J. B., Hansen L. F., Wemmer D. E. Site selective bis-intercalation of homodimeric Thiazole Orange dye in DNA oligonucleotides // Nucl. Acids Res.—1995.—23, N 5.—P. 753—760.
- Carlsson C., Larsson A., Jonsson M., Albinsson B., Norden B. Optical and photophysical properties of the Oxazole yellow DNA probes YO and YOYO // J. Phys. Chem.—1994.—98, N 40.—P. 10313—10321.
- Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—232 с.

УДК 535.372

Надійшла до редакції 04.10.2000