

Структурные характеристики интеркаляционного комплекса шпилечной формы дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) с антрациклиновым антибиотиком дауномицином

В. В. Костюков, В. И. Пахомов, Л. Н. Дымант

Севастопольский национальный технический университет
Студгородок, Севастополь, 99053, Украина

Viktor_Kostukov@mail.ru

Методами одно- и двухмерной ^1H ЯМР-спектроскопии и молекулярной механики исследован интеркаляционный комплекс шпильки дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) с антрациклиновым антибиотиком дауномицином в водно-солевом растворе. Определены равновесные термодинамические параметры комплексообразования, рассчитана пространственная структура комплекса, проведен сравнительный анализ конформационных и энергетических параметров шпильки гептамера без лиганда и в составе комплекса. Изучена молекулярная динамика комплекса в наносекундном временном интервале, оценена подвижность его структурных элементов. Проанализировано взаимодействие комплекса с ближайшим водным окружением.

Ключевые слова: шпилька d(GCGAAGC), дауномицин, интеркаляция, ЯМР-спектроскопия, молекулярная динамика.

Введение. Известно, что в нативных ДНК, содержащих палиндромные нуклеотидные последовательности, могут образовываться стабильные шпилечные структуры, являющиеся потенциальными местами узнавания для белков [1—3]. Детальные физико-химические и структурные характеристики шпилек, необходимые для выяснения их роли в биологических процессах, целесообразно определять на коротких фрагментах ДНК, способных формировать шпилечные структуры. Установлено, что шпильки ДНК, имеющие неканоническую пурин-пуриновую пару оснований в малой (3—4 нуклеотида) петле, проявляют высокую устойчивость к действию высоких температур [4—6] и нуклеаз [7]. Эти мини-петли обнаружены в ряде биологически важных шпилечных структур. Например, петли d(GCA) найдены в хромосомах человека [4] и бактерии *Streptomyces* [8], d(GAA) и d(AAA) —

© В. В. КОСТЮКОВ, В. И. ПАХОМОВ, Л. Н. ДЫМАНТ. 2006

на 3'-концевых участках ДНК вируса MVM [9], d(GGA) — в промоторах РНК-полимеразы бактериофага N4 [10]. При этом стебли шпилек с подобными петлями могут состоять всего из двух G:C пар при сохранении высокой стабильности таких гептамерных шпилечных форм [6, 7]. Среди них шпилька дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) с петлей GAA характеризуется наибольшей устойчивостью к действию нуклеаз и имеет необычно высокую температуру плавления в условиях, близких к физиологическим ($T_m = 76,5$ °C в водном растворе при 0,1 М NaCl) [5]. Следует отметить, что последовательность d(GCGAAGC) может иметь важное биологическое значение, поскольку она была обнаружена на участках инициации репликации фага ϕX174 [11], вируса HSV-1 [12], бактерии *Escherichia coli* [13]. Высокая стабильность этой шпильки объясняется образованием двух водородных связей между основаниями G3 и

A5, а также благоприятными условиями для стэкинг-взаимодействия этой неканонической пары как с основаниями стебля шпильки, так и с неспаренным петлевым основанием A4 [5, 14]. Отметим, что фрагмент РНК γ (GCGAAGC) образует в тех же условиях значительно менее стабильную шпильку ($T_m \sim 27^\circ\text{C}$), поскольку известно, что конформации рибо- и дезоксирибонуклеотидов имеют существенные различия [5].

Для выяснения физических механизмов функционирования подобных неклассических структурных форм ДНК необходимы детальные исследования их пространственной организации, а также определение особенностей связывания биологически активных соединений с участками ДНК, содержащими такие структуры. В частности, значительный интерес представляет комплексообразование шпилечных форм ДНК с ароматическими молекулами. В работах [15—17] показано, что ароматические лиганды — фенантридиновый краситель бромистый этидий (ЕВ) и феноксазоновый антибиотик актиномицин D — преимущественно интеркалируют в стебель шпилечных структур. Следует отметить, что параметры встраивания ароматических лигандов в стебель шпилек могут существенно отличаться от параметров интеркаляции для дуплексной ДНК. Так, интеркаляция ЕВ в компактную структуру шпильки гептамера d (GCGAAGC) приводит к некоторому уменьшению ее температуры плавления [16], в то время как комплексообразование ЕВ с самокомплементарными дезоксиолигонуклеотидами сопровождается повышением их температуры плавления [18]. Однако связывание со шпилечными формами ДНК других интеркалирующих лигандов, в первую очередь, антиопухолевых антибиотиков, остается в настоящее время мало изученным и требует проведения новых экспериментальных и теоретических исследований.

В представленной работе изучали структурные особенности и конформационную динамику интеркаляционного комплекса шпильки дезоксигептануклеотида d (GCGAAGC) с антибиотиком дауномицином методами молекулярной механики с использованием данных, полученных при обработке одно- и двухмерных ^1H ЯМР-спектров [19].

Дауномицин (DAU) является антибиотиком антрациклиновой группы, обладает выраженными противоопухолевыми свойствами и эффективен при лечении острой формы миеломной лейкемии [20]. Один из механизмов фармакологического действия

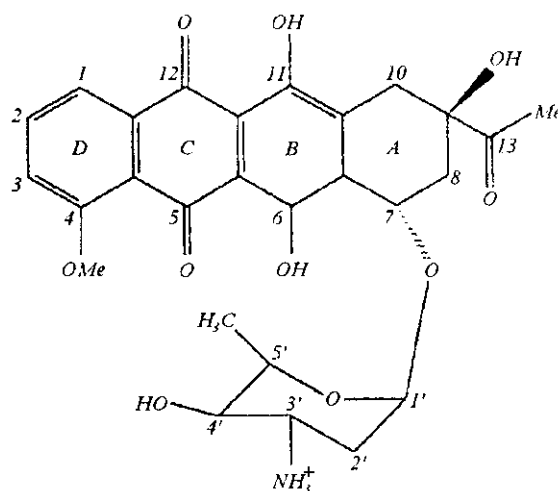


Рис. 1. Химическая структура молекулы дауномицина

DAU связан с его способностью интеркалировать в ДНК и тем самым ингибировать репликацию ДНК и транскрипцию РНК. Молекула DAU имеет плоский агликонный хромофор в виде системы сопряженных шестичленных колец и положительно заряженное аминсахарное кольцо, ориентированное практически перпендикулярно хромофору (рис. 1). В отличие от многих других типичных интеркаляторов ДНК DAU не проявляет выраженной специфичности к определенной нуклеотидной последовательности. Исследования его связывания с короткими дезоксиолигонуклеотидными дуплексами в водно-солевом растворе показали, что этот антибиотик преимущественно интеркалирует в терминальные сайты олигонуклеотидов, располагаясь на концевом триплетном участке [21, 22]. Подобную посадку молекулы DAU наблюдали и при кристаллографических исследованиях комплексов антибиотика с дезоксигексамерами [23]. Можно предположить, что и в нативных ДНК повышенное сродство к связыванию DAU способны проявлять конформационно менее стабильные участки, например, с неканоническим спариванием оснований, внутренние петли, шпильки и т. д.

Материалы и методы. Для уточнения расчетной пространственной структуры интеркаляционного комплекса гептамера d (GCGAAGC) с DAU использованы данные одно- и двухмерной корреляционной (2M-NOESY) ^1H ЯМР-спектроскопии [19]. В ЯМР-эксперименте исследованы водно-солевые растворы гептамера с антибиотиком. Дауномицин («Fluka», Великобритания) и дезоксигептануклеотид 5'- d (GpCpGpApArGpC) («OSWEL DNA

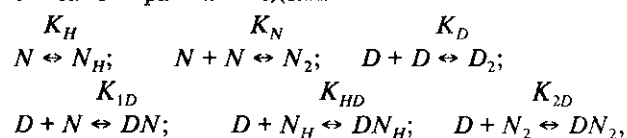
SERVICE», Великобритания) лиофилизировали из 99,95 % D₂O и растворяли в 0,1 М фосфатном буфере (pD 7,1), содержащем 10⁻⁴ моль/л EDTA. Одномерные ¹H ЯМР-спектры получены на спектрометре «Bruker DRX» с резонансной частотой 500 МГц, двухмерные 2D-NOESY гомоядерные — на спектрометре «Bruker AMX» (600 МГц). Измерены зависимости химических сдвигов протонов DAU от концентрации дезоксигептануклеотида в растворе при температурах T₁ = 303, T₂ = 308 и T₃ = 313 К. При титровании концентрацию лиганда поддерживали постоянной — 0,6 мМ, концентрацию гептамера изменяли в пределах от 1,42 до 0,052 мМ. Температурную зависимость химических сдвигов протонов DAU измеряли в диапазоне температур от 293 до 363 К при постоянных концентрациях гептамера и лиганда: N₀ = 0,61 мМ, D₀ = 0,6 мМ.

Пространственную структуру и конформационную динамику комплекса шпильки структуры дезоксигептануклеотида с антибиотиком DAU рассчитывали при помощи программы X-PLOR [24] с силовым полем CHARMM27 [25]. Для представления электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовали сдвиговую (shift) и переключающую (switch) функции соответственно с расстоянием усечения r_{cut} = 12 Å [26]. Для задания параметров атомных взаимодействий использованы кристаллографическая структура молекулы DAU [27] и величины электрических зарядов атомов лиганда, полученные в [28] на основе квантово-механических расчетов. Конформационные параметры стартовой конфигурации стебля шпильки формы гептамера, состоящего из двух G:C пар, соответствовали классической В-форме ДНК. Начальную конформацию петли шпильки выбирали таким образом, чтобы (согласно [5, 14]) азотистые основания петли G3 и A5 образовывали неканоническую (sheared) пару, а положение основания A4 соответствовало вертикальному стэкинг-взаимодействию с G3. Молекулу DAU встраивали в стебель шпильки так, что аминоканальное кольцо лиганда располагалось со стороны малой канавки минидуплекса [29]. Олигонуклеотидную цепь терминировали с 5'- и 3'-концов ОН-группами. Нейтрализацию избыточных электрических зарядов фосфатов в гептамере обеспечивали шестью ионами Na⁺, находящимися в стартовых конфигурациях на расстояниях 6 Å от атомов фосфора вдоль биссектрис углов O1P-P-O2P [30]. Водное окружение модели-

ровали молекулами воды TIP3P [31], размещенными в кубическом боксе с ребром 35 Å, первоначально содержащем 1432 молекулы воды. При совмещении центров масс водного бокса и ДНК удаляли все молекулы воды, атомы кислорода которых находились на расстояниях, меньших 2,7 Å, от неводородных атомов гептамера, лиганда и ионов Na⁺. В результате моделируемая система содержала 1235 молекул воды. Оптимизацию геометрии комплекса DAU со шпилькой гептамера осуществляли, минимизируя потенциальную энергию молекулярной системы. Диэлектрическую проницаемость среды принимали равной единице. На первом этапе минимизации фиксировали положения всех атомов гептамера и антибиотика, а также ионов Na⁺ для ускорения релаксации водного окружения к равновесному состоянию, второй этап минимизации проводили с фиксацией только атомов гептамера. На окончательном этапе оптимизацию геометрии осуществляли без каких-либо ограничений на движения атомов. После минимизации потенциальной энергии системы рассчитывали молекулярную динамику (МД) по алгоритму Verlet [32] при постоянной температуре T = 298 К с временным шагом Δt = 2 фс и ограничением тепловых движений атомов водорода по алгоритму Shake [33]. Все молекулы воды, находящиеся на расстоянии менее 5 Å от граней водного бокса, фиксировали для исключения их вылета в вакуум. Свободная водная оболочка имела толщину ~4 Å. Время эволюции комплекса составляло 1,2 нс, координаты атомов записывали через 1 пс.

Для анализа влияния комплексообразования с DAU на взаимодействие шпильки с ближайшим водным окружением рассчитана также МД шпильки формы без интеркалятора в течение 640 пс при идентичных условиях моделирования. Для установления конформационных изменений гептамера при интеркаляции антибиотика использовали усредненную структуру шпильки d(GCGAAGC) без лиганда, полученная в работе [14].

Результаты и обсуждение. Анализ концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов протонов антибиотика показал, что молекулярное равновесие в растворе может быть описано в рамках модели



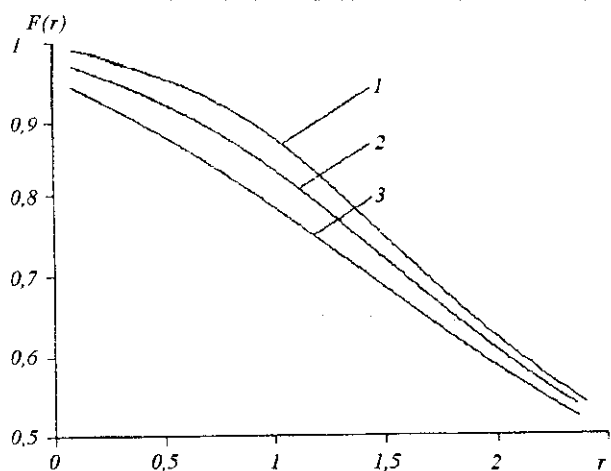


Рис. 2. Зависимость относительного содержания комплекса шпильки d(GCGAAGC) с дауномицином от соотношения исходных концентраций r ($r = N_0/D_0$) при $T = 303$ К (1), 308 К (2) и 313 К (3)

в которой учитываются реакции образования шпильчатой (N_H) и дуплексной (N_2) форм гептамера, димеризации лиганда (D_2), формирования комплексов антибиотика с мономерной однонитчатой (DN) и шпильчатой (DN_H) структурами, а также с неполнокомплементарным дуплексом дезоксигептануклеотида (DN_2) при равновесных константах взаимодействия K_H , K_N , K_D , K_{1D} , K_{HD} и K_{2D} соответственно. Указанной схеме отвечают следующие расчетные значения равновесных констант и энтальпий ΔH комплексообразования ($T = 298$ К, 0,1 М Na-фосфатный буфер, рD 7,1): $K_{HD} = (72 \pm 12) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{1D} = (48 \pm 8) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_{2D} = (3100 \pm 360) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ и $\Delta H_{HD} = -(99 \pm 9)$ кДж/моль, $\Delta H_{1D} = -(81 \pm 8)$ кДж/моль, $\Delta H_{2D} = -(58 \pm 7)$ кДж/моль. Из концентрационных зависимостей рассчитаны также предельные значения химических сдвигов протонов лиганда в мономерной форме δ_m и в составе комплекса со шпилькой δ_{HD} . Индуцированные химические сдвиги $\Delta\delta = \delta_m - \delta_{HD}$, характеризующие магнитное экранирование протонов лиганда в комплексе со шпильчатой формой гептамера, при этом были равны 0,50; 0,34; 0,11; 0,50 м. д. для протонов H2, H10e, H1' и протонов оксиметильной группы OMe DAU соответственно (рис. 1). Значения $\Delta\delta$ этих протонов вычисляли также для расчетной структуры комплекса по модели эквивалентного магнитного диполя с учетом данных квантово-механических расчетов магнитного экранирования ядер атомов лиганда азотистыми основаниями [34].

В результате сравнения значений констант комплексообразования выяснено, что вероятность

образования комплекса DAU со шпилькой существенно ниже, чем с дуплексом гептамера. Вместе с тем содержание комплексов при равновесии в растворе существенно зависит также от исходных концентраций взаимодействующих молекул и температуры раствора. В смешанном растворе антибиотик—гептамер перераспределение конформационных состояний гептамера в пользу шпильчатой формы [35] приводит к тому, что доля комплексов DAU со шпилькой весьма высока, несмотря на сравнительно небольшое значение константы комплексообразования K_{HD} .

На рис. 2 приведено относительное содержание комплекса шпильчатой конформации гептамера с антибиотиком в зависимости от соотношения концентраций олигонуклеотида и лиганда r ($r = N_0/D_0$) при различных температурах. Расчет показывает, что для условий, при которых был измерен 2M-NOESY спектр ($N_0 = 0,61$ мМ, $D_0 = 0,6$ мМ, $T = 303$ К), комплекс шпильки с DAU преобладает в сравнении с другими видами ассоциатов гептамера с антибиотиком, его доля составляет ~87 %. Все это дает основание предположить, что наблюдаемые в спектре 2M-NOESY корреляции между протонами гептамера и протонами DAU в большей степени относятся именно к данному типу комплекса. Его расчетная температура плавления составляет ~48 °С, что существенно ниже температуры плавления шпильки без лиганда.

На рис. 3 представлено расширение спектра 2M-NOE раствора дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) с DAU в области резонансов ароматических протонов. Обнаруженные в спектре межмолекулярные кросс-пики и их относительные интенсивности, по которым проводили оценку межпротонных расстояний, приведены в табл. 1. Наиболее интенсивные кросс-пики 2M-NOE наблюдаются между протонами лиганда и протонами терминальных нуклеотидов, что указывает на преимущественное встраивание хромофора антибиотика между G:C парами оснований в стебле шпильки. Как и в случае шпильки без встроенного в нее лиганда [5, 14, 35], имеет место существенное смещение резонанса протона H4' нуклеотида A4 в петле шпильки в более сильное поле (примерно на 2 м. д.). Кроме того, сохраняется кросс-пик между протоном H4'(A4) и протоном H8(A5). Эти факты свидетельствуют об отсутствии значительных конформационных перестроек в петле шпильки при интеркаляции DAU.

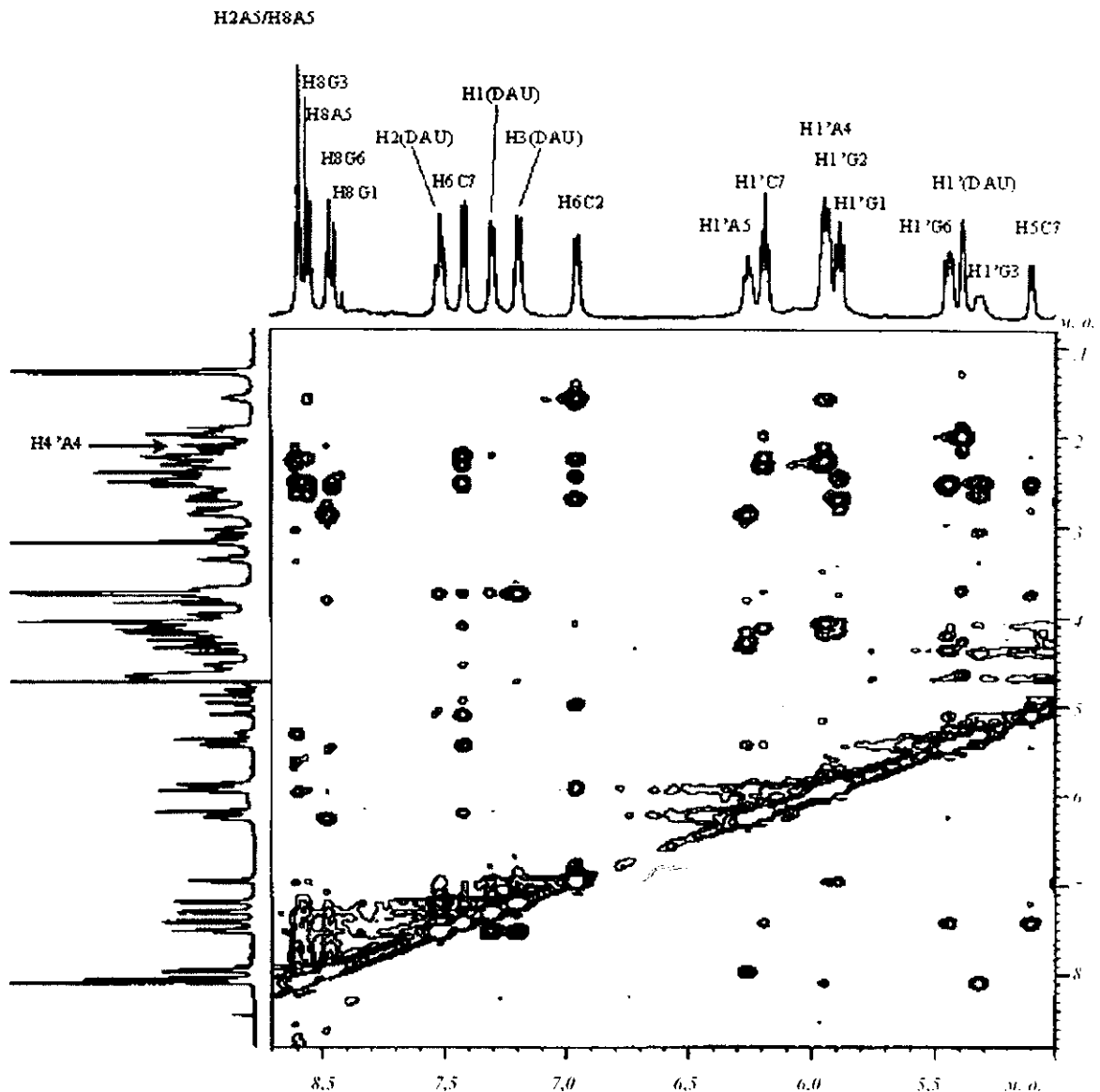


Рис. 3. Расширение контурного 2D-NOE спектра (600 МГц, $\tau_m = 200$ мс) водного раствора гептамера d(GCGAAGC) с дауномицином при $T = 303$ К, $N_0 = 0,61$ мМ, $D_0 = 0,60$ мМ

Расчетная пространственная структура комплекса, наиболее согласующаяся с данными ЯМР-спектроскопии по магнитному экранированию протонов хромофора лиганда соседними парами азотистых оснований, а также по значениям расстояний между протонами антибиотика и гептамера [36], представлена на рис. 4. Показано, что при встраивании лиганда в стебель шпильки основные конформационные изменения происходят на участке интеркаляции, а петля шпильки достаточно консервативна. Значения среднеквадратичных отклонений (СКО) координат атомов при интеркаляции

антибиотика составили 0,3–0,6 Å для всех азотистых оснований шпильки, кроме концевых G1 и C7, для которых СКО = 4,6 и 3,5 Å соответственно. Величина радиуса инерции шпильочной структуры при образовании комплекса с DAU возрастает от 7,11 [14] до 7,54 Å, главным образом, за счет линейного смещения концевой пары азотистых оснований при частичном раскручивании стебля. Торсионные углы α и γ нуклеотидов стебля при комплексообразовании переходят из $-gaos$, $+gaos$ в $+gaos$, $-gaos$ области соответственно. Углы ϵ и ζ несколько изменяются, но остаются в пределах

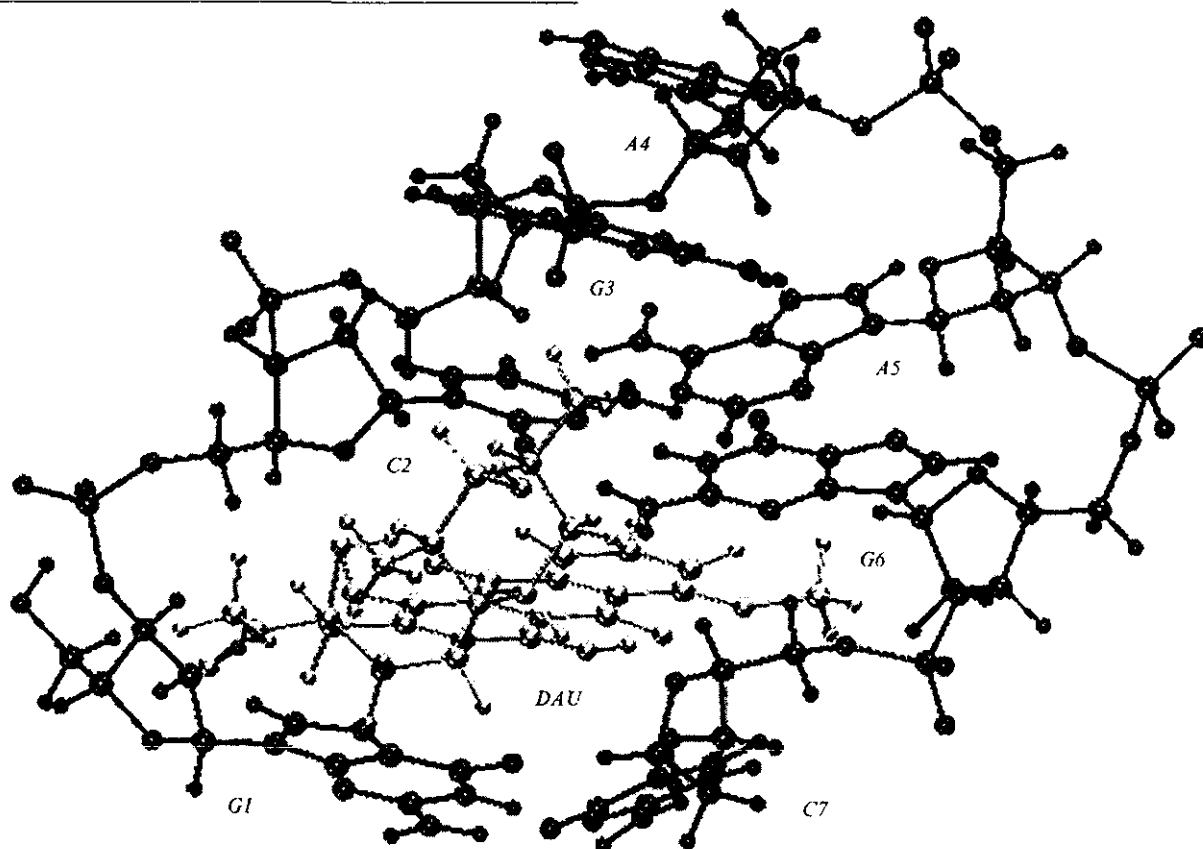
Таблица 1

Кросс-пики NOE между протонами дезоксигептануклеотида $d(GCGAAGC)$ и протонами DAU ($N_0 = 0,61$ мМ, $D_0 = 0,6$ мМ, $T = 303$ К, $0,1$ М фосфатный буфер, $pD 7,1$)

Протон DAU	Протон гептамера	Относительная интенсивность кросс-пика
H3 OCH ₃ (4)	H5(C7)	Слабый
	H5(C7)	Средне-слабый
	H5(C7)	Средне-слабый
	H5'(C7)	Слабый
	H2''(C7)	Слабый
H3'	H2'(C7)	Слабый
	H1'(C7)	Слабый
H10e	H1'(G1)	Средний
	H5(C7)	Слабый
	H4'(G1)	Слабый
H2'/2''	H1'(C7)	Средне-слабый
	H5'(C7)	Слабый
H8a	H2''(G1)	Слабый
	H5'(A4)	Слабый
CH ₃	H2'(G1)	Средний

транс-гош, характерных для конформации ДНК В1 типа. Фазовые углы псевдповращения P для дезоксирибоз всех нуклеотидов, за исключением G1, находятся в пределах $128-176^\circ$, что отвечает конформациям C1'-экзо и C2'-эндо. Для фуранозного кольца звена G1 расчетной структуры величина $P = \sim 30^\circ$ (конформация C3'-эндо). Оказалось, что интеркаляция DAU в шпильку сравнительно мало влияет на значения гликозидных углов всех нуклеотидов, при этом в нуклеотидах G3 и A5 неканонической пары взаимная ориентация азотистых оснований и сахарных колец соответствует *син*-конформации, в других звеньях цепи — *анти*-конформации.

Хромофор антибиотика, интеркалированный в стебель шпильки гептамера, повернут на угол $\Psi \sim 107^\circ$ относительно продольной оси пары оснований C2:G6. Аминосахарное кольцо DAU располагается со стороны малой канавки двуспирального минидуплекса. При этом гликозидный угол, определяющий ориентацию кольца относительно хромофора антибиотика и измеряемый по расположению ато-

Рис. 4. Расчетная пространственная структура комплекса шпильки гептамера $d(GCGAAGC)$ с дауномицином

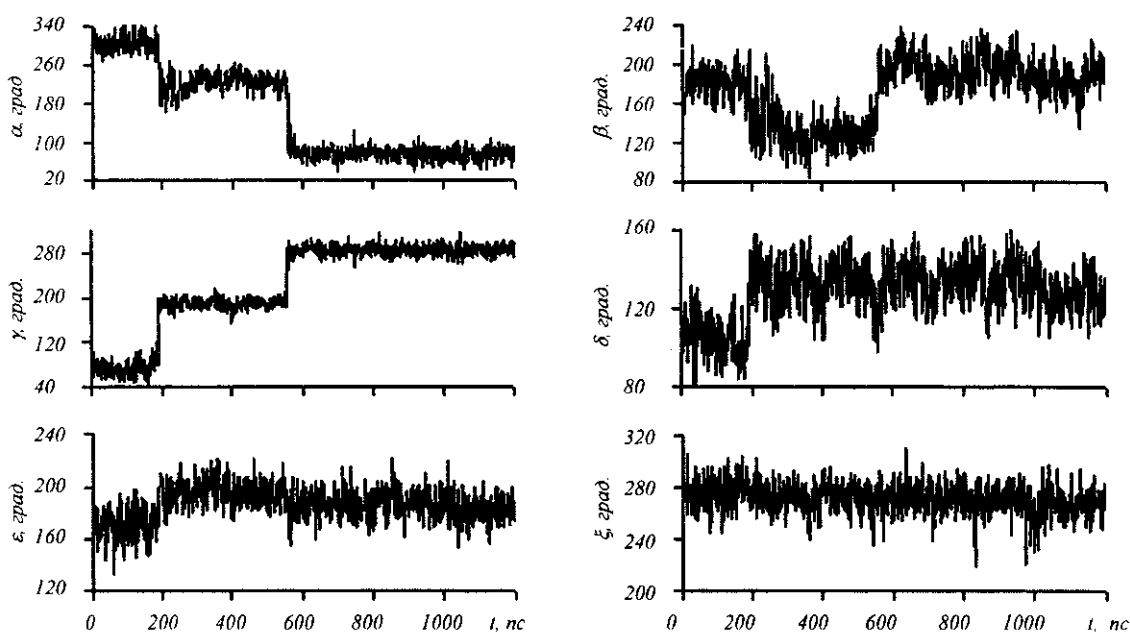


Рис. 5. Зависимости значений торсионных углов α , β , γ , δ , ϵ и ζ сахаро-фосфатного остова нуклеотида C2 шпильки гептамера d(GCGAAGC) в комплексе с дауномицином от времени моделирования

мов C7-O7-C1'-C2', составляет $\sim 155^\circ$. Отметим, что этот угол в комплексах DAU с дуплексами гексамеров, по данным рентгеноструктурного анализа, обычно лежит в пределах $137\text{--}162^\circ$ [37]. Образование комплекса шпилька—DAU вызывает раскручивание пар оснований в месте интеркаляции примерно на 18° , при этом угол спирального вращения Ω между второй C2:G6 и третьей G3:A5 парами уменьшается незначительно (приблизительно на 3°). Расстояние между парами азотистых оснований в участке интеркаляции увеличивается на $\sim 4 \text{ \AA}$, что соответствует раздвижению пар при образовании комплекса DAU с дезоксиолигонуклеотидными дуплексами [37]. Угол пропеллера пары C2:G6 шпильки в комплексе имеет нехарактерное для В-формы ДНК довольно большое положительное значение $\omega = 13,7^\circ$, в то же время угол излома κ этой пары составляет $10,6^\circ$.

В исследуемом комплексе антибиотика со шпилькой выявлены две межмолекулярные водородные связи с участием атомов N3'(DAU)—O1P(A4) и N3'(DAU)—N1(A5), способствующие стабилизации аминокислотного кольца DAU в комплексе. Расчеты показали достаточную стабильность в исследованном временном интервале значений большинства конформационных параметров комплекса (рис. 5). Существенные изменения на начальном этапе эволюции системы при температуре 298 К претерпевают только пространственные углы

α и γ нуклеотидных звеньев стебля шпильки, испытывающие синхронные скачкообразные переходы из $+g_{01}$ и $-g_{01}$ в $-g_{01}$ и $+g_{01}$ области соответственно.

Пространственные углы по сахаро-фосфатному остову гептамера меняются в процессе теплового движения атомов с СКО, не превышающими 20 % от их средних значений. СКО угла между продольными осями хромофора и пары оснований C2:G6 равны не более 4° , а пространственного угла C7-O7-C1'-C2' в антибиотике — 8° . Расстояние между атомами O3'(C2) и O3'(G6), характеризующее ширину гликозидного желобка мини-дуплекса, для шпильки без лиганда составляет $\sim 15,1 \text{ \AA}$ [14], а в расчетной структуре комплекса с DAU — $14,3 \text{ \AA}$.

Из анализа траекторий движений атомов следует, что крупномасштабные конформационные перестройки происходят, в основном, в течение начальных 400—600 пс. После этого периода времени практически отсутствует систематический дрейф конформационных параметров комплекса (рис. 5). В течение последних 40 пс МД величины СКО координат неводородных атомов шпильки гептамера и антибиотика DAU в комплексе составили $0,42$ и $0,58 \text{ \AA}$ соответственно.

В табл. 2 представлены расчетные значения энергий взаимодействия между различными элементами в моделируемых молекулярных системах. Видно, что встраивание лиганда приводит к неко-

Таблица 2

Энергии атом-атомных взаимодействий (ккал/моль) в шпильчатой структуре гептамера $d(GCGAAGC)$ и комплексе с дауномицином (DAU)

Взаимодействие	$d(GCGAAGC)$			$d(GCGAAGC) + DAU$		
	E_{total}	E_{vdw}	E_{elec}	E_{total}	E_{vdw}	E_{elec}
E_H	-756,4	-55,0	-813,4	-720,3	-33,5	-794,4
E_{G1-C2}	-16,3	-7,4	-8,9	-1,1	-0,3	-0,8
E_{G2-C3}	-9,0	-6,5	-2,5	-10,7	-8,4	-2,3
E_{G3-A4}	-13,7	-10,0	-3,7	-13,9	-10,4	-3,5
E_{A4-A5}	-2,4	-1,4	-1,0	-1,4	-0,9	-0,5
E_{A5-G6}	-12,7	-10,0	-2,7	-10,1	-9,2	-0,9
E_{G6-C7}	-18,6	-8,9	-9,7	-2,6	-0,8	-1,8
E_{G1-C7}	-21,5	-1,2	-20,3	-18,3	-2,0	-16,3
E_{C2-G6}	-25,6	-0,7	-24,9	-26,0	0,2	-26,2
E_{G3-A5}	-10,0	-0,9	-9,1	-10,5	-1,6	-8,9
E_{G1-G6}	5,4	-3,0	8,4	-0,2	-0,1	-0,1
E_{C2-C7}	3,8	-0,6	4,4	-0,4	-0,1	-0,3
E_{C2-A5}	1,1	-2,5	3,6	-1,6	-1,5	-0,1
E_{G3-G6}	-7,3	-1,3	-6,0	-10,6	-2,0	-8,6
E_{H-DAU}	—	—	—	-223,9	-59,5	-164,4
E_{H-W}	-1190,1	-76,4	-1113,7	-942,4	-67,2	-875,2
E_{NB-W}	-263,7	-46,5	-217,2	-239,3	-37,1	-202,2
E_{PB-W}	-926,4	-29,9	-896,5	-703,1	-30,1	-673,0
E_{DAU-W}	—	—	—	-63,6	-29,8	-33,8

Примечание. E_{total} — общая энергия; E_{vdw} — энергия Ван-дер-Ваальса; E_{elec} — электростатическая энергия; H , $H-W$, $H-DAU$ — взаимодействия внутри шпильчатой структуры (также приведены энергии взаимодействий между некоторыми парами азотистых оснований), шпильки с водным окружением, шпильки с антибиотиком соответственно; $NB-W$, $PB-W$ — взаимодействия азотистых оснований и сахаро-фосфатного остова шпильки гептамера с водным окружением.

торому уменьшению абсолютного значения общей энергии E_{total} внутримолекулярных взаимодействий в гептамере, как правило, за счет нарушения вертикального стэкинг-взаимодействия между азотистыми основаниями стебля и соответственно изменения E_{vdw} . Значения энергий взаимодействия между азотистыми основаниями петли шпильки изменяются сравнительно мало. В G3:A5 паре оснований наблюдается некоторое перераспределение составляющих энергии их взаимодействия в сторону снижения роли электростатического притяжения и увеличения вклада энергии Ван-дер-Ваальса E_{vdw} . Вместе с тем абсолютное значение полной энергии для этой пары более чем в 2 раза меньше, чем у соседней уотсон-криковской пары стебля C2:G6. Неспаренное основание A4 стабилизируется в шпильчатой структуре, в основном, вследствие вертикального стэкинга с G3, взаимодействие с которым на порядок выгоднее, чем с основанием

A5. Следует отметить также, что раскручивание пар оснований в участке интеркаляции лиганда обеспечивает некоторое увеличение модуля энергии взаимодействия между основаниями G3 и G6, плоскости которых довольно сильно перекрываются при характерной геометрии некомплементарной G3:A5 пары. Абсолютное значение энергии взаимодействия шпильки гептамера с водным окружением несколько снижается при встраивании лиганда за счет уменьшения доступной для воды поверхности шпильки при укладке аминсахарного кольца DAU со стороны малой канавки мини-дуплекса.

Вследствие конформационных перестроек в шпильчатой структуре гептамера при связывании с лигандом повышаются, в частности, гидратационные индексы атомов O2(C7), N7(G6) и N1(A4) с 0,72, 1,40 и 1,13 до 1,59, 1,85 и 1,28 соответственно и снижаются для атомов O4' сахарных колец всех звеньев гептамера (рис. 6). Гидратационные индек-

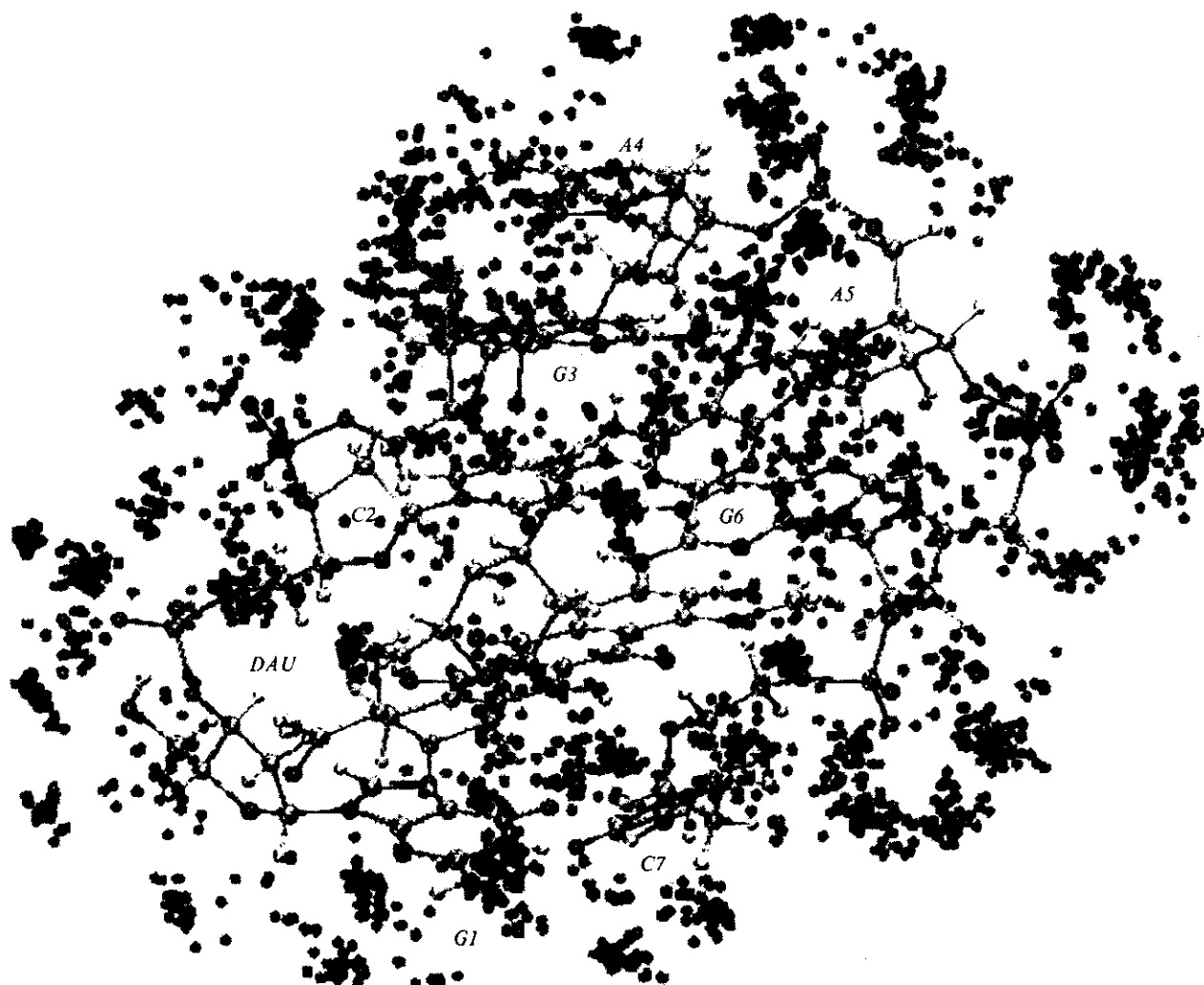


Рис. 6. Структура гидратной оболочки комплекса шпильки d(GCGAAGC) с дауномицином

сы определяли из расчетных траекторий теплового движения атомов как средние количества Н-связей между молекулами воды и гидрофильными атомами комплекса за последние 40 пс МД. Наличие Н-связи фиксировалось, если расстояния между электроотрицательным атомом гептамера или DAU и атомами кислорода и водорода молекулы воды не превышали 3,2 и 2,4 Å соответственно. Среди электроотрицательных атомов DAU в наибольшей степени гидратированы атомы кислорода O13, O4 и O5, для которых гидратационный индекс равен ~0,9. По указанному критерию водородной связи определяли также наличие водных мостиков. Наиболее стабильный мостик с участием одной молекулы воды образуется между атомами N3(G6) гептамера и O4, O5 антибиотика. Такие конфигурации наблюдаются в ~60 % случаев вдоль расчетных

траекторий атомов. С несколько меньшей вероятностью проявляются водные мостики между O13(DAU) и N3(G1), O3'(G1), O5'(C2), а также между O9(DAU) и O3'(C2), O1P(C2). Всего, согласно расчетам, с комплексом связаны примерно 60 молекул воды, из них около шести — с молекулой DAU, приблизительно 55 — со шпилькой гептамера и, в среднем, одна молекула воды образует устойчивый межмолекулярный водный мостик. В то же время ближайшая водная оболочка расчетной шпилечной структуры без лиганда насчитывает около 65 молекул.

Таким образом, полученная пространственная структура комплекса DAU со шпилечной формой дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) находится в хорошем соответствии со значениями индуцированных химических сдвигов и межмолекулярных

кросс-пиков 2M-NOE. Расчеты показали, что стабилизация комплекса происходит, в основном, за счет вертикального стэкинг-взаимодействия между хромофором антибиотика и азотистыми основаниями стебля шпильки, а также межмолекулярных водородных связей. Конформационные параметры стебля шпильки в комплексе с DAU остаются в пределах В-формы ДНК, при этом раскручивание пар оснований на участке интеркаляции составляет $\sim 18^\circ$. Основные изменения в структуре шпильки при интеркаляции лиганда происходят, главным образом, за счет конформационных перестроек более подвижной концевой пары азотистых оснований. В то же время петля, содержащая неканоническую G:A пару, при встраивании хромофора антибиотика в стебель шпильки характеризуется высокой стабильностью.

V. V. Kostjukov, V. I. Pahomov, L. N. Dimant

Structural characteristics of intercalation complex of deoxyheptanucleotide hairpin d(GCGAAGC) with anthracycline antibiotic daunomycin

Summary

The investigation of intercalation complex of deoxyheptanucleotide d(GCGAAGC) hairpin and anthracycline antibiotic daunomycin (DAU) in aqueous-saline solution has been performed by one- and two-dimensional ^1H NMR spectroscopy and molecular mechanics methods. The equilibrium thermodynamic parameters of complexation have been obtained. The spatial structure of the complex has been calculated and the comparative analysis of conformational and energetic parameters of associated and free heptamer hairpin has been carried out. The molecular dynamics of the complex in nanosecond time scale has been studied and mobility of structure elements has been evaluated. The interaction of the complex of heptamer-DAU with nearest hydration shell has been analyzed.

Keywords: hairpin d(GCGAAGC), daunomycin, intercalation, ^1H NMR spectroscopy, molecular dynamics.

В. В. Костюков, В. И. Пахомов, Л. Н. Димант

Структурні характеристики інтеркаляційного комплексу шпилькової форми дезоксигептануклеотиду d(GCGAAGC) з антрацикліновим антибіотиком дауноміцином

Резюме

Методами одно- та двовимірної ^1H ЯМР-спектроскопії і молекулярної механіки досліджено інтеркаляційний комплекс шпильки дезоксигептануклеотиду d(GCGAAGC) з антрацикліновим антибіотиком дауноміцином у водно-сольовому розчині. Визначено рівноважні термодинамічні параметри комплексоутворення, розраховано просторову структуру комплексу, проведено порівняльний аналіз конформаційних та енергетичних параметрів гептамеру без ліганду та в складі комплексу. Вивчено молекулярну динаміку комплексу у наносекундному часовому інтервалі, оцінено рухливість його структурних

елементів. Проаналізовано взаємодію комплексу з найближчим водним оточенням.

Ключові слова: шпилька d(GCGAAGC), дауноміцин, інтеркаляція, ЯМР-спектроскопія, молекулярна динаміка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spiro C., Richards J. P., Chandrasekaran S., Brennan R. G., McMurray C. T. Secondary structure creates mismatched base pairs required for high-affinity binding of cAMP response element-binding protein to the human enkephalin enhancer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90.—P. 4606—4610.
2. Miao D.-M., Honda Y., Tanaka K., Higashi A., Nakamura T., Taguchi Y., Sakai H., Komano T., Bagdasarian M. A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF1010 // Nucl. Acids Res.—1993.—21.—P. 4900—4903.
3. Froelich-Ammon S. J., Gale K. C., Osheroff N. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II: DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/cleavage // J. Biol. Chem.—1994.—269.—P. 7719—7725.
4. Zhu L., Chou S.-H., Reid B. R. A single G-to-C change causes human centromere TGGAA repeats to fold back into hairpins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 12159—12164.
5. Hirao I., Kawai G., Yoshizawa S., Nishimura Y., Ishido Y., Watanabe K., Miura K. Most compact hairpin-turn structure exerted by a short DNA fragment, d(GCGAAGC) in solution: an extraordinarily stable structure resistant to nucleases and heat // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—P. 576—582.
6. Hirao I., Nishimura Y., Tagawa Y., Watanabe K., Miura K. Extraordinarily stable mini-hairpins: electrophoretic and thermal properties of the various sequence variants of d(GCGAAGC) and their effect on DNA sequencing // Nucl. Acids Res.—1992.—20.—P. 3891—3896.
7. Yoshizawa S., Ueda T., Ishido Y., Miura K., Watanabe K., Hirao I. Nuclease resistance of an extraordinarily thermostable mini-hairpin DNA fragment, d(GCGAAGC) and its application to *in vitro* protein synthesis // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—P. 2217—2221.
8. Huang C.-H., Lin Y.-S., Yang Y.-L., Huang S.-W., Chen C. W. The telomeres of streptomyces chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures // Mol. Microbiol.—1998.—28.—P. 905—916.
9. Astell C. R., Chow M. B., Ward D. C. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication // J. Virol.—1985.—54.—P. 171—177.
10. Dai X., Greizerstein M. B., Nadas-Chinni K., Rothman-Denes L. B. Supercoil-induced extrusion of a regulatory DNA hairpin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 2174—2179.
11. Arai K., Low R., Kobori J., Shlomai J., Korberg A. Mechanism of dnaB protein action. V. Association of dnaB protein, protein n', and other prepriming proteins in the primosome of DNA replication // J. Biol. Chem.—1981.—256.—P. 5273—5280.
12. Elias P., Lehman I. R. Interaction of origin binding protein with an origin of replication of herpes simplex virus 1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 2959—2963.
13. Cowing D. W., Bardwell J. C. A., Craig E. A., Woolford C., Hendrix R. W., Gross C. A. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82.—P. 2679—2683.
14. Padrta P., Stefl R., Kralik L., Zidek L., Skenar V. Refine-

- ment of the d(GCGAAGC) hairpin structure using one- and two-bond residual dipolar coupling // *J. Biomol. NMR.*—2002.—24.—P. 1—14.
15. *Rentzeperis D., Alessi K., Marky L. A.* Thermodynamics of DNA hairpins: contribution of loop size to hairpin stability and ethidium binding // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21.—P. 2683—2689.
 16. *Веселков А. Н., Пахомов В. И., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф., Такер А., Дэвис Д.* Исследование комплексообразования бромистого этидия с палиндромной последовательностью 5'-d(GpCpGpApArGpC) в водном растворе методом ¹H-ЯМР-спектроскопии // *Молекуляр. биология.*—1998.—32, № 4.—С. 639—648.
 17. *Brown D. R., Kurz M., Kearns D. R., Hsu V. L.* Formation of multiple complexes between actinomycin D and a DNA hairpin: structural characterization by multinuclear NMR // *Biochemistry.*—1994.—33.—P. 651—664.
 18. *Davies D. B., Veselkov A. N.* Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ¹H NMR spectroscopy // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*—1996.—92.—P. 3545—3557.
 19. *Веселков А. Н., Итон Р. Дж., Семанин А. В., Пахомов В. И., Дымант Л. Н., Караваяев Л., Дэвис Д. Б.* ЯМР-анализ комплексообразования ароматических лигандов с дезоксигептануклеотидом 5'-d(GCGAAGC), образующим стабильную шпильчатую структуру в водном растворе // *Молекуляр. биология.*—2002.—36, № 5.—С. 880—890.
 20. *Arcaione F., Penso S.* Anthracyclines and anthracenedione-based anticancer agents.—New York: Elsevier, 1988.—125 p.
 21. *Веселков А. Н., Итон Р. Дж., Барановский С. Ф., Осетров С. Г., Пахомов В. И., Болотин П. А., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б.* Анализ взаимодействия антибиотика дауномицина с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TpGpCpA) в водном растворе методом ЯМР-спектроскопии // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 2.—С. 154—162.
 22. *Barthwal R., Sharma U., Srivastava N., Jain M., Awasthi P., Kaur M., Barthwal S. K., Govil G.* Structure of daunomycin complexed to d-TGATCA by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Eur. J. Med. Chem.*—2006.—41.—P. 27—39.
 23. *Nunn C. M., Van Meervelt L., Zhang S., Moore M. H., Kennard O.* DNA-drug interactions — the crystal structures of d(TGTACA) complexed with daunomycin // *J. Mol. Biol.*—1991.—22.—P. 167—177.
 24. *Brunger A. T.* X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR.—Yale: Univ. press, 1992.—382 p.
 25. *MacKerell A. D., Banavali N.* All-atom empirical force field for nucleic acids. II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution // *J. Comp. Chem.*—2000.—21.—P. 105—120.
 26. *Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M.* CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations // *J. Comp. Chem.*—1983.—4.—P. 187—217.
 27. *Frederick C. A., Williams L. D., Ughetto G., van der Marel G. A., van Boom J. H., Rich A., Wang A. H.* Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin // *Biochemistry.*—1990.—29.—P. 2538—2549.
 28. *Cieplak P., Rao S. N., Grootenhuys P. D. J., Kollman P. A.* Free energy calculation on base specificity of drug-DNA interactions: application to daunomycin and acridine intercalation into DNA // *Biopolymers.*—1990.—29.—P. 717—727.
 29. *Davies D. B., Eaton R. J., Baranovsky S. F., Veselkov A. N.* NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—2000.—17.—P. 887—901.
 30. *Ravishanker G., Auffinger P., Langley D. R., Jayaram B., Young M. A., Beveridge D. L.* Treatment of counterions in computer simulations of DNA // *Rev. Comp. Chem.*—1997.—11.—P. 317—372.
 31. *Jorgensen W., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R., Klein M.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.*—1983.—79.—P. 926—935.
 32. *Verlet L.* Computer «experiments» on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules // *Phys. Rev.*—1967.—159.—P. 98—103.
 33. *Ryckaert J. P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C.* Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes // *J. Comput. Phys.*—1977.—23.—P. 327—341.
 34. *Pullman B.* Molecular mechanisms of specificity in DNA-antitumor drug interactions // *Adv. Drug Res.*—1989.—18.—P. 1—113.
 35. *Веселков А. Н., Пахомов В. И., Барановский С. Ф., Дэвис Д. Б.* Анализ конформационных состояний олигонуклеотида с палиндромной последовательностью 5'-d(GpCpGpApArGpC) методом ¹H-ЯМР-спектроскопии // *Молекуляр. биология.*—1997.—31, № 6.—С. 1036—1042.
 36. *Wijmenga S. S., Mooren M. M. W., Hilbers C. W.* NMR of macromolecules. A practical approach // London: Oxford Univ. press, 1993.—288 p.
 37. *Trieb M., Rauch C., Wellenzohn B., Wibowo F., Loerting T., Mayer E., Liedl K. R.* Daunomycin intercalation stabilizes distinct backbone conformations of DNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—2004.—21.—P. 713—723.

УДК 577.32:577.113

Надійшла до редакції 30.03.06