

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами.

Механізм взаємодії монометинового ціанінового барвника Суап 40 з двоспиральною ДНК: дослідження методами комп'ютерного моделювання

О. Я. Яковенко, А. Г. Голуб, М. Ю. Лосицький¹, В. Г. Бджола, С. М. Ярмолук

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Просп. Глушкова, 6, Київ, 03022, Україна

E-mail: sergiy@yarmoluk.org.ua

Механізм взаємодії ціанінового барвника Суап 40 з молекулами ДНК вивчено методами комп'ютерного моделювання. Оцінено енергію взаємодії термінальних частин π -електронних хмар гетероциклічних кілець нуклеотидних основ ДНК та барвника Суап 40 методами ab initio. Запропоновано механізм взаємодії Суап 40 з молекулами ДНК відповідно до моделі повної інтеркаляції. На основі комбінованих розрахунків методами Amber, MM+, AM1, PM3 та ab initio доведено енергетичну вигідність зв'язування Суап 40 з ДНК за механізмом повної інтеркаляції порівняно з механізмом напівінтеркаляції. Знайдено ряд метастанів, що ілюструють гіпотезу послідовної взаємодії Суап 40 з ДНК в три етапи: асоціація з ДНК у малій борозенці, взаємодія з ДНК за типом напівінтеркаляції бензотіазоловим кільцем та остаточна фіксація Суап 40 між парами основ ДНК за механізмом повної інтеркаляції.

Вступ. Детекція нуклеїнових кислот у гелях, розчинах та біологічних системах є широковживаним методом для вирішення різноманітних завдань сучасної біології та медицини. Представники класу ціанінових барвників є найчутливішими зондами для специфічної детекції ДНК. Такі зонди взаємодіють з ДНК за кулонівськими, ван-дер-ваальсовими та гідрофобними механізмами і при цьому значно підвищують інтенсивність флуоресценції. Для глибшого розуміння процесів взаємодії ціанінових барвників з ДНК важливо знати механізм зв'язування зондів з ДНК.

В літературі описано три основних механізми взаємодії ціанінів з ДНК: борозенкове зв'язування, коли барвник розташований в борозенці ДНК [1],

інтеркаляція, за якої плоска молекула ціаніну розташована між парами нуклеотидних основ ДНК [2], та напівінтеркаляція, коли один з гетероциклічних залишків ціаніну інтеркалює між парами основ, тоді як інший гетероцикл міститься в борозенці [3].

В одній з наших попередніх робіт для детекції ДНК запропоновано монометиновий ціаніновий барвник Суап 40 (рис. 1) [4] та вивчено його спектрально-люмінесцентні характеристики у водному розчині та в присутності ДНК [3]. Зроблено припущення стосовно напівінтеркаляційного характеру взаємодії Суап 40 з ДНК [5, 6]. Проте, оскільки ці дані отримано непрямым шляхом, то висновок про саме напівінтеркаляційну взаємодію Суап 40 з ДНК не можна вважати остаточним.

Останніми роками одним з потужних методів дослідження міжмолекулярних взаємодій стало

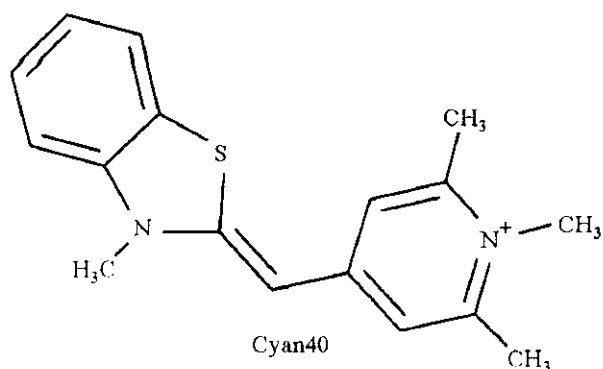


Рис. 1. Структурна формула барвника Суан 40

комп'ютерне моделювання. За допомогою квантовохімічних методів розрахунку, що моделюють кулонівські, ван-дер-ваальсові та гідрофобні взаємодії, можна в певному наближенні відтворити процеси, що дійсно мають місце на молекулярному рівні.

Завданням роботи було проведення пошуку сайта та механізму зв'язування барвника Суан 40 з ДНК.

Матеріали і методи. Для пошуку первинних сайтів зв'язування Суан 40 з ДНК використано програму AutoDock v3.5 (<http://w3.to/autodock>), за допомогою якої здійснено аналіз методом гнучкого молекулярного докінгу (вбудовування однієї молекули — Суан 40 — з системою гнучких торсійних кутів в іншу — ДНК). Для пошуку взаємних стеричних модифікацій ДНК та Суан 40 застосовано оптимізацію геометрії силовим полем GROMACS програми GROMACS v3.0 (www.gromacs.org) та силовим полем AMBER програми HyperChem v5.1 (<http://www.hyper.com>). Оптимізацію внутрішньомолекулярної енергії ниток ДНК та Суан 40 здійснено напівемпіричними методами AM1 та PM3 програм ArgusLabs v1.2 (<http://www.planaria-software.com>) та HyperChem v5.1. Для розрахунку сайта зв'язування та конформації барвника в комплексі з ДНК, а також для оптимізації та оцінки енергії міжмолекулярної взаємодії використано програмний пакет для квантовомеханічних обчислень GAMESS (<http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS//GAMESS.html>). Всі розрахунки проводили на комп'ютері Intel Pentium (700 MHz, 390MB RAM, 10GB HDD).

Результати і обговорення. Однією з важливих складових завдання визначення механізму взаємодії між ДНК та барвником є питання щодо можливого ступеня інтеркаляції молекули барвни-

ка в ДНК. Серед сучасних напівемпіричних підходів не існує жодного методу, який міг би в достатній мірі відобразити ефект стекінг-взаємодій — взаємодії термінальних частин π -електронних хмар гетероциклів, зближених на відстань 0,34 нм. Тому було вибрано метод квантовохімічних розрахунків *ab initio* як єдиний адекватний метод для теоретичної оцінки енергетичної стабільності комплексів ДНК—барвник.

На першому етапі здійснено пошук та порівняння можливих сайтів борозенкового зв'язування Суан 40 (рис. 1) з ДНК. За допомогою програми AutoDock v3.5 проведено глобальний аналіз ланцюга ДНК довжиною 40 н. п., взятих довільно з бази даних програми HyperChem v5.1. При цьому методом Lamarckian Genetic Algorithm послідовно перебирали можливі значення двогранного кута між площинами бензотіазолового та піридинового кілець Суан 40 з дискретністю в один градус. У результаті програмою AutoDock було знайдено ряд можливих сайтів зв'язування Суан 40 з борозенкою ДНК та показано, що енергетично найвигіднішим є зв'язування з послідовністю ACCGGT по малій борозенці ДНК. В той же час комплексів з локалізацією молекули Суан 40 у великій борозенці молекули ДНК знайдено не було. Ймовірно, що основна причина неможливості взаємодії молекул по великій борозенці ДНК полягає у низькій стеричній відповідності молекули Суан 40 та згаданої ділянки ДНК.

Не отримавши в експерименті з випадково зібраною ДНК значного домінування певного сайта зв'язування над іншими, було вирішено провести глобальний пошук енергетично найвигіднішого сайта. Для цього послідовно було проаналізовано комплекси, утворені зв'язуванням Суан 40 з малою борозенкою усіх можливих динуклеотидних послідовностей ДНК. Останні як мінімальний сайт були обрані для аналізу з огляду на геометричні параметри ліганду, оскільки довжина Суан 40 складає 1,23 нм, а довжина динуклеотиду по малій борозенці становить 1,28 нм. Значення енергії взаємодії Суан 40 з різними динуклеотидними ділянками ДНК по малій борозенці наведено в табл. 1.

Таким чином, показано, що утворення комплексів Суан 40 з борозенкою ДНК відбувається лише в малій борозенці, причому всі сайти мають близькі значення енергії утворення комплексів з Суан 40.

На другому етапі було порівняно енергії комплексоутворення Суан 40 з ДНК за механізмом інтеркаляції та зв'язування по малій борозенці.

Сумарна енергія електростатичних, ван-дер-ваальсових та гідрофобних взаємодій, розрахована

Таблиця 1

Потенціальна енергія (кДж/моль) взаємодії барвника Суан 40 з різними послідовностями ДНК за механізмом локалізації барвника в малій борозенці ДНК

Нуклеотидна послідовність	Енергія зв'язування, кДж/моль	Енергія міжмолекулярної взаємодії, кДж/моль	Енергія напруження конформації, кДж/моль
AA-TT	-9,49	-6,89	-9,38
AC-GT	-9,52	-6,68	-9,17
AT-TA	-9,59	-6,93	-9,42
AG-CT	-10,2	-7,32	-9,81
CC-GG	-9,16	-6,15	-8,64
CG-CG	-9,77	-6,73	-6,22

програмою AutoDock, значно відрізнялася для борозенкового та інтеркаляційного комплексів (-10,2 та -14,4 кДж/моль відповідно). Враховуючи додаткову стабілізуючу дію стекинг-взаємодій на інтеркаляційні комплекси, яку програма AutoDock не могла коректно відобразити, зроблено висновок щодо низької вірогідності зупинки процесу асоціації ДНК та Суан 40 на етапі локалізації барвника в борозенці ДНК. Разом з цим висока доступність борозенки ДНК та відносно глибока потенціальна яма згаданого положення свідчать про високу ймовірність утворення комплексу Суан 40 з борозенкою ДНК як перший етап багатостадійного процесу асоціації молекул ДНК та Суан 40.

Далі було здійснено пошук можливих позицій для інтеркаляції чи напівінтеркаляції Суан 40 в ДНК. Для цього застосовували послідовні сеанси оптимізації геометрії 16 штучно утворених комплексів ДНК—Суан 40 методами AMBER, MM+ та AM1. Було перевірено всі чотири можливі нуклеотидні системи для В-форми. В результаті оптимізації отримано як повністю інтеркальовані, так і напівінтеркаляційні комплекси трьох основних типів. Останні (рис. 2) додатково оптимізували напівемпіричним методом AM1.

Головна відмінність трьох отриманих нами напівінтеркаляційних комплексів полягала в конформації ланцюга ДНК навколо Суан 40. При напівінтеркаляції за типом «стопки монет» ароматичне кільце Суан 40 вбудовується паралельно до двох ароматичних кілець одного ланцюга ДНК, а елементарний йому ланцюг «розрихлюється», щоб заповнити утворену порожнину в спіралі ДНК. При напівінтеркаляції за типом «перехресту ланцюгів» ароматичне кільце Суан 40 орієнтується паралельно основам ДНК сусідніх ланцюгів, утворюючи структуру на зразок Z-форми ДНК з Суан 40 в зоні перехресту. При взаємодії за типом інтеркаляції в два ланцюги без перехресту — тип

«коробки» — ароматичне кільце Суан 40 розташовується між двома основами різних ланцюгів, які орієнтуються паралельно плоскому гетероциклу барвника (рис. 2).

Оскільки значна частка штучно утворених напівінтеркаляційних комплексів після оптимізації ставала комплексами з повною інтеркаляцією, було зроблено припущення щодо проходження процесу зв'язування Суан 40 з ДНК у дві стадії: напівінтеркаляцію та подальшу повну інтеркаляцію Суан 40.

На наступному етапі аналізу проводили оптимізацію геометрії структур квантовомеханічними методами *ab initio* за допомогою програмного пакету GAMESS.

Для дослідження енергії інтеркаляції барвника в ДНК здійснено повний скринінг усіх можливих варіантів π -електронної взаємодії між кільцями Суан 40 та нуклеотидними основами. Для взаємодії чотирьох нуклеотидних основ ДНК з різними гетероциклами барвника розраховано одноелектронну енергію, що характеризує взаємодію електронів з ядрами атомів, двоелектронну енергію, яка є мірою взаємодії двох електронів між собою, енергію відштовхування ядер, що описує взаємодію ядер в молекулі, а також суму цих енергій. Для розрахунків використано базисний набір N21-G з NGUASS = 6. Дані розрахунків подані в табл. 2.

З даних цієї таблиці видно, що взаємодія термінальних частин π -електронних хмар гетероциклів збільшує енергію електронного відштовхування, тобто електронні орбіталі змінюють свою форму, внаслідок чого енергія міжатомних взаємодій зменшується, що позитивно впливає на комплексоутворення за механізмом повної інтеркаляції. Однак енергетичні параметри такої взаємодії досить малі, що, на нашу думку, дозволяє моделювати системи ДНК—барвник, подібний до Суан 40, простішими методами за типом молекулярної ме-

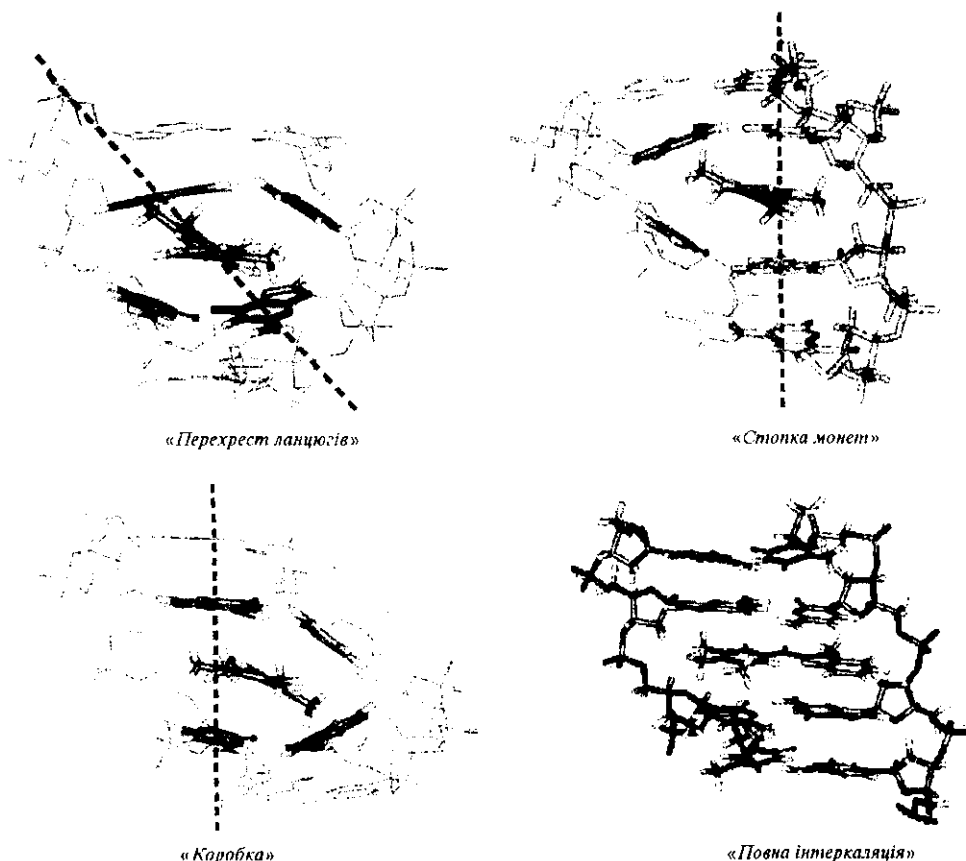


Рис. 2. Варіації позицій повної та напівінтеркаляції Суап 40 у молекулу ДНК

ханіки, силових полів AMBER, GROMOS, CHARMM тощо з похибкою в межах ± 16 Дж/моль та обов'язковим врахуванням π -електронної взаємодії.

Ці розрахунки дозволяють зробити висновок стосовно перебігу процесу утворення комплексу між ДНК та барвником Суап 40, який полягає в тому, що такий процес має протікати в три етапи: асоціація з ДНК в малій борозенці, взаємодія з ДНК за типом напівінтеркаляції бензотіазоловим кільцем та остаточна фіксація Суап 40 між парами основ ДНК за механізмом повної інтеркаляції.

Ця гіпотеза була перевірена шляхом порівняння енергій двох однакових фрагментів ДНК, занурених у водяні бокси однакових розмірів, що містять однакову кількість молекул води для повної інтеркаляції та напівінтеркаляції молекули Суап 40. Було сконструйовано оптимальну послідовність для напівінтеркаляції барвника в ДНК — 3'-ХХТ-Суап 40-АХХ-5'—3'-ХХА-Суап 40-ТХХ-5' у водному оточенні, де Х — довільна основа, яка була вибрана випадково. Для розрахунку обрано систему 3'-dC-dT-dA-Суап 40-dT-dT-dC-5' — 5'-dG-dA-dT-Суап 40-dA-dA-dG-5' у водяному боксі з 759 молекулами води. Методами молекулярної ме-

ханіки MM+ з урахуванням даних квантовомеханічних методів *ab initio* оцінено вищезазначену структуру у випадку повної інтеркаляції та напівінтеркаляції Суап 40 до вказаного сайту. Використано наступні параметри для процесу моделювання: electrostatic — bond dipoles, cutoff — none, gradient — 0.3, algorithm — Block Diagonal. Енергії інтеркаляційного та напівінтеркаляційного комплексів виявилися рівними відповідно $-1755,52$ та $-1744,04$ Дж/моль, що відповідає вірогідній взаємодії за механізмом повної інтеркаляції. З цього випливає, що інтеркаляція Суап 40 відбувається внаслідок перекриття π -електронних хмар гетероциклічних компонентів молекул барвника та ДНК, а також гідрофобних взаємодій, і ці два фактори роблять приблизно однаковий внесок у сумарний енергетичний ефект інтеркаляції.

Висновки. Таким чином, у даній роботі на основі комп'ютерних розрахунків зроблено висновок про те, що енергетично найвигіднішою для Суап 40 моделлю зв'язування з ДНК є повна інтеркаляція. Слід зазначити, що такий результат не суперечить отриманим раніше експериментальним результатам про напівінтеркаляційну взає-

Таблиця 2

Енергія стейкінг-взаємодій основ ДНК з гетероциклами Суан 40, розрахована програмою GAMESS

Основа	$E_{бт}$, еВ	$E_{пир}$, еВ	$E_{осн}$, еВ	$E_{барв}$, еВ	$\Delta E_{бт}$, Дж/моль	$\Delta E_{пир}$, Дж/моль
Ade						
Одноелектронна енергія	-8377,98	-8479,47	-1634,04	-6743,94	-0,00032	-31970,5
Двоелектронна енергія	3648,755	3700,167	665,6752	2983,079	$-3,2 \cdot 10^{-5}$	16194,75
Енергія відштовхування ядер	3108,24	3158,319	505,2648	2602,975	0,000126	15775,15
Сума енергій	-1620,98	-1620,99	-463,098	-1157,89	$-9,4E-05$	-0,60741
Cyt						
Одноелектронна енергія	-7637,81	-7747,61	-1243,8	-6394	0	-34588,4
Двоелектронна енергія	3303,939	3359,97	495,4753	2808,464	0,000189	17649,54
Енергія відштовхування ядер	2784,668	2838,437	357,0212	2427,647	-0,00016	16937,05
Сума енергій	-1549,2	-1549,2	-391,306	-1157,89	0,000157	-1,83661
Gua						
Одноелектронна енергія	-8893,9	-9039,3	-1919,9	-3097,834	0	-45801,6
Двоелектронна енергія	3883,62	3956,228	785,7867	2718,28	0	22871,34
Енергія відштовхування ядер	3314,744	3387,566	596,4647	2718,28	-0,00019	22938,73
Сума енергій	-1695,54	-1695,51	-537,646	-1157,89	-0,00022	8,456899
Thy						
Одноелектронна енергія	-8143,1	-8156,59	-1487,7	-6655,4	0	-4250,67
Двоелектронна енергія	3537,65	3545,022	598,8563	2938,794	0,000158	2322,359
Енергія відштовхування ядер	2997,588	3003,699	438,861	2558,727	$-6,3 \cdot 10^{-5}$	1924,942
Сума енергій	-1607,86	-1607,87	-449,982	-1157,88	$-3,2 \cdot 10^{-5}$	-3,36704

П р и м і т к а. $E_{осн}$ та $E_{барв}$ — енергії відповідно нуклеотидної основи та барвника; $E_{бт}$ та $E_{пир}$ — енергії системи барвник—основа, коли основа знаходиться біля бензотіазолового та піридинового гетероциклів відповідно на відстані 0,34 нм; $\Delta E_{бт} = E_{бт}(E_{осн} + E_{барв})$, а $E_{пир} = E_{пир}(E_{осн} + E_{барв})$

модію Суан 40 з ДНК. Адже, згідно з результатами даної роботи, повна інтеркаляція є не єдиним можливим, а лише найвигіднішим механізмом взаємодії, що, ймовірно, реалізується при взаємодії окремої молекули Суан 40 з ДНК. Проте у випадку існування ряду додаткових факторів, що мали місце в досліді, як-то утворення агрегату між вільною та інтеркальованою молекулами Суан 40 [5], чи введення до молекули барвника об'ємних заміників [6], енергетична вигідність різних механізмів зв'язування може змінитися на користь напівінтеркаляції, що й було показано у виконаних раніше експериментах.

O. Ya. Yakovenko, A. G. Golub, M. Yu. Losytsky, V. G. Bdzholo, S. M. Yarmoluk

The mechanism of interaction of monomethine cyanine dye Cyan 40 with dsDNA: computer modelling.

Summary

The mechanism of interaction of cyanine dye Cyan 40 and DNA was studied by molecular modelling methods. The energy of interaction

of the terminal parts of π -electrons clouds of aromatic heterocycles of DNA bases with Cyan 40 molecule was calculated by ab initio methods. We supposed that Cyan 40 interacted with dsDNA according to full-intercalation binding mode. Using combination of Amber, MM+, AM1, PM3 and ab initio calculation methods, the full-intercalation interaction of Cyan 40 with DNA was proved to be more favourable energetically than half-intercalation one. The series of the dye-DNA complex metastates were found, illustrating the hypothesis of three consequent stages of Cyan 40 interaction with DNA: (1) association of Cyan 40 with DNA minor groove, (2) interaction by half-intercalation mechanism, and (3) fixation of Cyan 40 between DNA bases pairs by the mechanism of full-intercalation.

A. Ya. Yakovenko, A. G. Golub, M. Yu. Losytsky, V. G. Bdzholo, S. M. Yarmoluk

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. Механизм взаимодействия монометинового цианинового красителя Суан 40 с двухспиральной ДНК: исследование методами компьютерного моделирования

Резюме

Механизм взаимодействия цианинового красителя Суан 40 с молекулами ДНК изучен методами компьютерного моделиро-

ванія. Оцінена енергія взаємодіяння терминальних частей π -електронних оболок гетероцикліческих колець нуклеотидних оснований ДНК и красителя Суап 40 методами *ab initio*. Предложен механизм взаємодіяння Суап 40 с молекулами ДНК согласно модели полной интеркаляції. На основании комбинированных расчетов методами Amber, MM+, AM1, PM3 и *ab initio* доказана энергетическая выгода связывания Суап 40 с ДНК по механизму полной интеркаляції по сравнению с механизмом полуинтеркаляції. Найден ряд метасостояний, иллюстрирующих гипотезу последовательного взаимодействия Суап 40 с ДНК в три этапа: ассоциация с ДНК в малой бороздке, взаимодействие с ДНК по типу полуинтеркаляції бензотиазоловым кольцом и окончательная фиксация Суап 40 между парами оснований ДНК по механизму полной интеркаляції.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ogul'chansky T. Yu., Losytskyu M. Yu., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Yashchuk V. M., Yarmoluk S. M. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVIII. Formation of the carbocyanine dye J-aggregates in nucleic acid grooves // *Spectrochim. acta.*—2001.—57.—P. 2705—2715.
2. Nygren J., Svanvik N., Kubista M. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA // *Biopolymers.*—1998.—46.—P. 39—51.
3. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Kovtun Yu. P. Interaction of

cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of «half intercalation» of monomethyne cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 1.—P. 75—82.

4. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Smirnova T. V., Shandura M. P., Kovtun Yu. P., Matsuka G. Kh. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. II. Spectroscopic properties of methyleneoxy analogues of Thiazole Orange // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 6.—P. 74—81.
5. Огульчанський Т. Ю., Ящук В. М., Ярмолук С. М., Лосицький М. Ю. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 14. Спектральні особливості деяких монометинових бензотіазолових ціанінових барвників та їхньої взаємодії з ДНК // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 5.—С. 345—355.
6. Лукашов С. С., Лосицький М. Ю., Ярмолук С. М., Сломінський Ю. Л. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 12. Нові монометинові ціаніни на основі 5,6-метилендіоксibenзотіазолу та спектрально-люмінесцентні властивості їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 6.—С. 562—572.

УДК 577.366 + 577.113.7
Надійшла до редакції 27.12.01