

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА И СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ С ДНК В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2012 г. Д. С. Тарасов, М. Я. Ибрагимова, Е. Д. Изотова,
Н. И. Акберова, Р. И. Жданов

Представлено академиком А.Р. Хохловым 06.04.2012 г.

Поступило 17.04.2012 г.

Взаимодействие молекулы ДНК с низкомолекулярными лигандами представляет большой теоретический и практический интерес как для молекулярной биологии, так и для фармакологии [1]. ДНК является мишенью для пептидных антибиотиков, связывающихся по малой бороздке, а также различных противоопухолевых препаратов, взаимодействующих с ней как путем образования химических связей, так и нековалентно, за счет электростатических, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных сил [1, 2]. Присутствие жирнокислотных остатков во фракции липидов, прочно связанных с ДНК, было доказано для бактерий, в частности для грамотрицательного микроорганизма *Pseudomonas aurantiaca* [3]. В цикле работ по изучению стабильности комплексов олигомеров ДНК с липидами, С18-жирными кислотами и холестерином методами молекулярной механики высказано и доказано предположение о взаимодействии ДНК с природными жирными кислотами и об их возможной регуляторной роли в процессах экспрессии генов [4–6]. Большинство результатов основывается на моделировании ДНК-липидных комплексов в условиях вакуума и на основании анализа стационарных состояний комплексов и изолированных реагентов [5, 6]. В работе [7] ДНК-липидные комплексы исследованы методом молекулярного докинга, где эффекты растворителя учтены неявно и не учитывается конформационная подвижность молекулы ДНК.

Таким образом, исследование строения и конформационной динамики комплексов ДНК–жирные кислоты представляет несомненный интерес. После доказательства комплексообразования ДНК и липидов [8], в частности олеиновой кислоты [9], данные о пространственном строении и молекулярной динамике таких комплексов не были опубликованы. Линолеовую кислоту выбрали для компьютерных экспериментов по свя-

зыванию с ДНК, поскольку в митохондриях до 70% молекул природного фосфолипида кардиолипина содержат четыре ее остатка.

В работе комплексы олигонуклеотида ДНК, состоящего из 25 пар нуклеотидов А–Т $(dA)_{25} \cdot (dT)_{25}$ и линолевой кислоты (*транс*-октадека-9,12-диеновой кислоты), в нейтральной и ионизованной формах исследованы методом молекулярной динамики с использованием “явной модели растворителя”. Показано, что эти комплексы отличаются высокой конформационной подвижностью. Значения свободной энергии образования комплексов ДНК и линолевой кислоты, равные 8 и 13 ккал/моль (для аниона и кислоты соответственно), определены из траектории молекулярной динамики методом адаптивной смещающей силы. Показано, что протон кислоты участвует в образовании водородной связи с фосфорильной группой ДНК (длина связи в равновесной структуре равна 1.68 Å). Обнаружены две основные конформации комплекса линолевой кислоты с ДНК, причем при конформационной динамике происходит образование и разрушение взаимодействий между полярным или неполярным остатком линолевой кислоты, с одной стороны, и ДНК – с другой.

МЕТОДЫ

Структура лигандов и комплексов

Структурные параметры линолевой кислоты были получены из базы данных NCI-UP [10]. Структура двухцепочечного олигонуклеотида, состоящего из 25 А–Т-пар $(dA)_{25}(dT)_{25}$, была сгенерирована с помощью утилиты NAB из пакета программ AmberTools (AMBER 11, University of California, San Francisco, 2010). Координаты атомов комплексов даны в соответствии с общепринятой номенклатурой. Для получения начальных структур комплексов жирная кислота была помещена в малую бороздку ДНК (в их кристаллографических конфигурациях) с помощью программы VMD. Комплекс был растворен в прямоугольной ячейке периодичности с использованием TIP3P-модели молекул воды так, чтобы расстояние меж-

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Научно-исследовательский институт

общей патологии и патофизиологии

Российской академии медицинских наук, Москва

Таблица 1. Репрезентативные расстояния межатомных нековалентных взаимодействий для оптимизированных комплексов и в ходе динамики

| Этап молекулярной динамики | Расстояние между участками линолевой кислоты и ДНК, Å | | | | | |
|----------------------------------|---|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| | EIC41:C18-dT34:H5'1 | EIC41:C10-dT34:H1' | EIC41:H31-dT37:O1P | dA10:H1'-EIC41:C17 | dT35:H5'-EIC41:C13 | dT35:H5'-EIC41:C13 |
| | Нейтральная форма линолевой кислоты | | | Анион линолевой кислоты | | |
| После оптимизации | 2.96 | 2.88 | 1.68 | 3.57 | 2.67 | 2.83 |
| В конце молекулярной динамики | 3.77 | 5.62 | 4.89 | 3.14 | 5.76 | 3.10 |
| Среднее значение в ходе динамики | 5.669 | 9.22 | 4.87 | 4.34 | 5.19 | 2.91 |

ду периодическими образами комплекса составляло не менее 15 Å. Для обеспечения электронейтральности системы было добавлено необходимое количество ионов натрия. Для получения структуры была выполнена минимизация энергии с помощью метода сопряженных градиентов в программе NAMD [11]. При генерировании структуры ДНК использовали параметры силового поля AMBER99 [12]. Для характеристики лигандов применяли параметры GAFF (General Amber Force Field) с зарядами AM1-BCC.

Молекулярная динамика

Траекторию молекулярной динамики рассчитывали с помощью программного пакета NAMD. Длины связей были фиксированы с помощью алгоритма SHAKE, что позволило использовать шаг расчета траектории, равный 2 фс. Все траектории рассчитывали для 300 К. Перед расчетом свободной энергии связывания и сбором параметров система была приведена к равновесию в течение 200 пс. Полученные траектории анализировали с помощью программного пакета VMD, а также дополнительных скриптов, написанных на языке Python. При анализе нековалентных контактов между атомами жирных кислот и олигонуклеотида рассматривали атомы, расстояние между которыми не превышало 3.4 Å (эта величина соответствует максимуму ван-дер-ваальсова притяжения между атомами углерода).

Свободная энергия связывания

Свободную энергию связывания (A) определяли методом адаптивной смещающей силы [13], реализованным в программе NAMD [14]. Этот метод основан на вычислении средней силы F_x вдоль координаты реакции ξ , действие которой затем аннулируется равной по величине и противоположной по направлению смещающей силой, что позволяет системе преодолевать энергетические барьеры. Динамика системы по отношению к ξ соответствует случайному блужданию с нуле-

вой средней действующей силой. Значения F_x накапливаются на небольших отрезках (диапазонах) ξ , что позволяет оценить значение производной свободной энергии $dA(\xi)/d\xi$. В качестве координаты реакции использовали расстояние между центрами атомов линолевой кислоты и взаимодействующих с ними атомов олигонуклеотида. Вычисление свободной энергии связывания производили в ходе расчета 5-наносекундной траектории молекулярной динамики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение комплексов олигонуклеотида и линолевой кислоты

После оптимизации комплекса линолевой кислоты (EIC LA) и ДНК (рис. 1a) количество межатомных взаимодействий – ван-дер-ваальсовых контактов – между двумя структурами составило 106. EIC располагается параллельно фосфатным группам ДНК. Для анализа взаимной ориентации молекул нами были выбраны три атома в EIC и три атома в ДНК, находящихся ближе всего к выбранным атомам EIC. Атомы первой пары EIC41:H31-dT37:O1P располагаются на расстоянии друг от друга 1.68 Å (табл. 1). В этом случае имеет место образование водородной связи между водородом карбоксильной группы EIC и кислородом фосфатной группы ДНК. Расстояние между атомами в следующей паре EIC41:C10-dT34:H1' составляет 2.88 Å. В ней участвуют атомы углерода EIC, образующие двойную связь в самой EIC, и атом водорода дезоксирибозы при остатке пиримидина. Между предпоследним углеродным атомом в EIC и атомом водорода дезоксирибозы при пиримидине (dT34:H5'1) расстояние составляет 2.96 Å.

В анионной форме количество расстояний между атомами ДНК и линолевой кислоты, равных менее 3.4 Å, на 30% меньше по сравнению с нейтральной формой и составляет 74 (рис. 1б). При описании комплекса анионной формы EIC и ДНК нами были выбраны те же группы атомов,

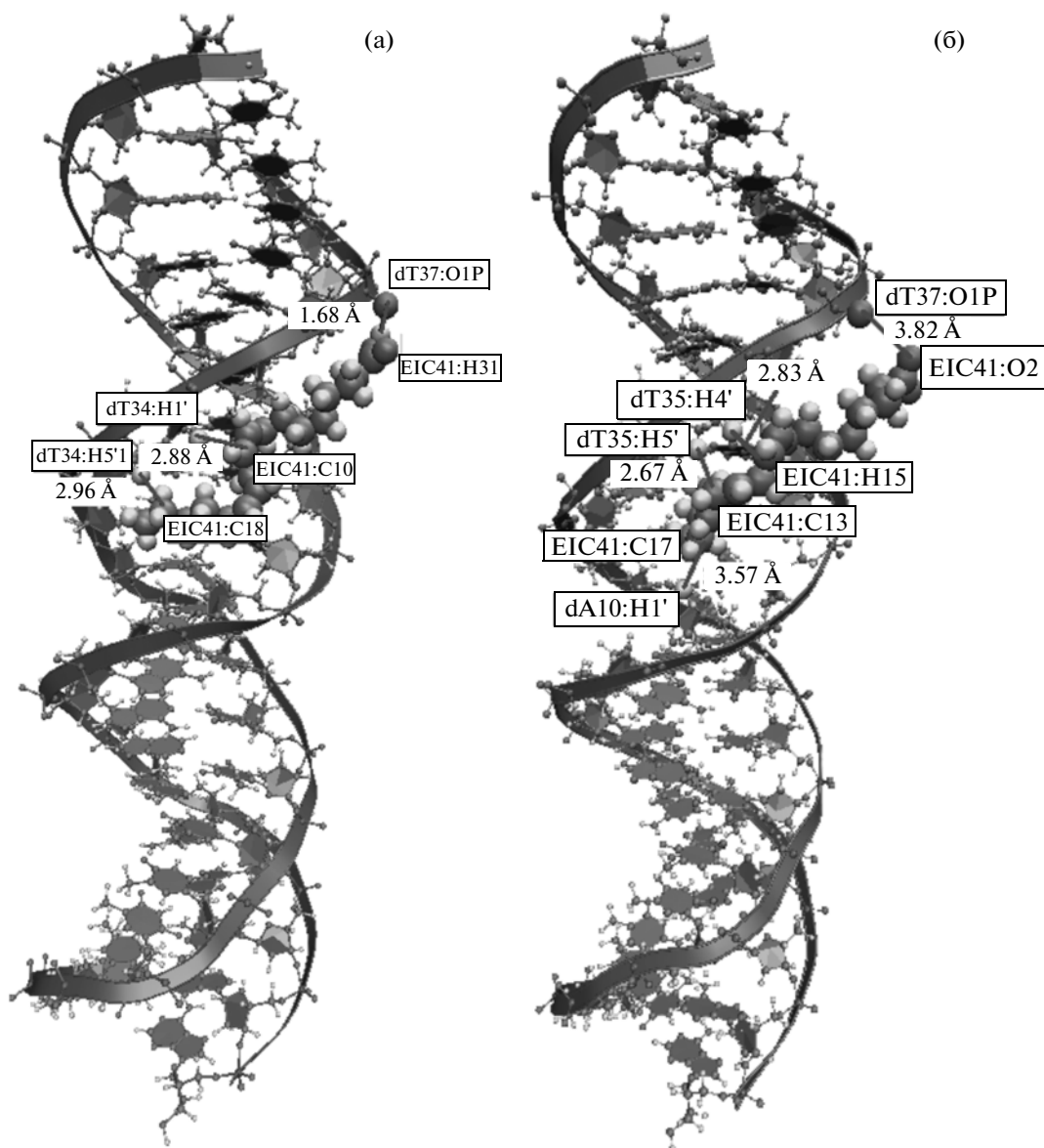


Рис. 1. Структура комплексов жирных кислот и олигонуклеотида $(dA)_{25} \cdot (dT)_{25}$ (компьютерный эксперимент с помощью программного пакета NAMD). а – линолевая кислота (нейтральная форма). б – анион линолевой кислоты; ориентация цепи ДНК изменена для обеспечения лучшего угла обзора комплекса (атомы кислорода – черные, углерода – серые, водорода – белые).

что и при описании предыдущего комплекса. Из-за отсутствия водорода карбоксильная группа приобретает отрицательный заряд, что приводит к отдалению “головки” жирной кислоты от отрицательно заряженного кислорода фосфатной группы ДНК, поэтому расстояние dT37:O1P-EIC41:O2, составляет 3.82 Å. При этом углероды при двойной связи в анионе взаимодействуют не с водородами дезоксирибозы, а с водородами фосфатных групп. Предпоследний углерод жирной кислоты расположен от водорода дезоксирибозы на расстоянии 3.57 Å. Таким образом, центр молекулы жирной кислоты распо-

лагается ближе к ДНК по сравнению с ее полярной частью и гидрофобным “хвостом”.

Молекулярная динамика

Молекулярная динамика комплекса нейтральной линолевой кислоты показывает большую конформационную подвижность лиганда (рис. 2). Линолевая кислота удерживается в малой бороздке ДНК за счет углеводородного “хвоста”, в то время как COOH-группа и центральная часть молекулы (атомы начиная с C9) периодически теряют контакт с атомами ДНК (рис. 3). Это хорошо видно

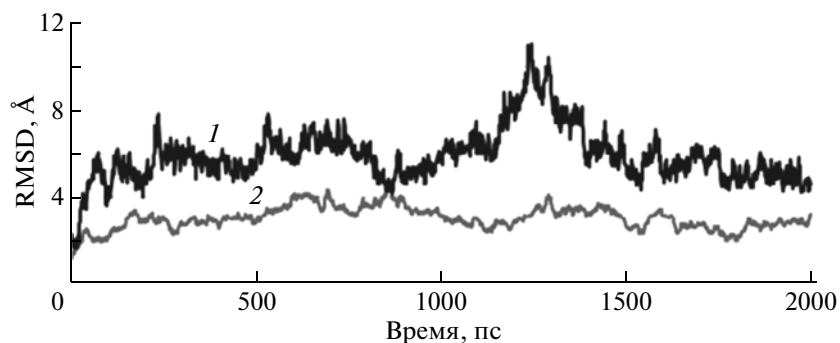


Рис. 2. Изменение среднеквадратичного отклонения координат структур (RMSD) в ходе молекулярной динамики со временем. 1 – линолевая кислота, 2 – ДНК.

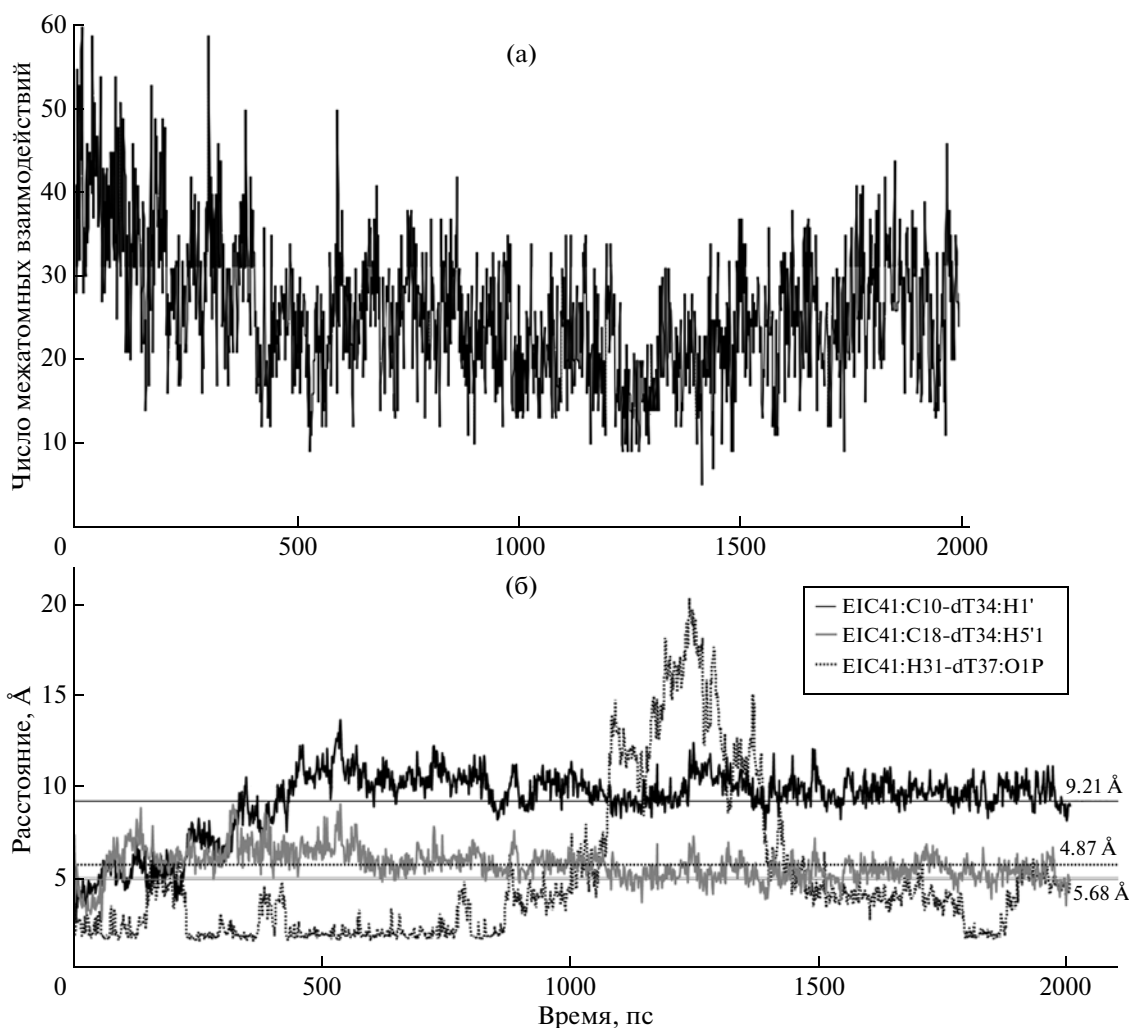


Рис. 3. Динамика межатомных нековалентных взаимодействий ДНК и линолевой кислоты (нейтральной). а – изменение общего числа взаимодействий между ДНК и линолевой кислотой со временем. б – изменение расстояния между репрезентативными атомами ДНК и линолевой кислоты со временем.

по динамике образования и разрыва водородной связи между Н31 линолевой кислоты и кислородом одной из фосфатных групп ДНК. Несмотря на это, молекула линолевой кислоты остается

связанной в течение 2 нс динамики. Для аниона линолевой кислоты оптимизированная структура изначально содержит меньшее число межатомных нековалентных взаимодействий, чем струк-

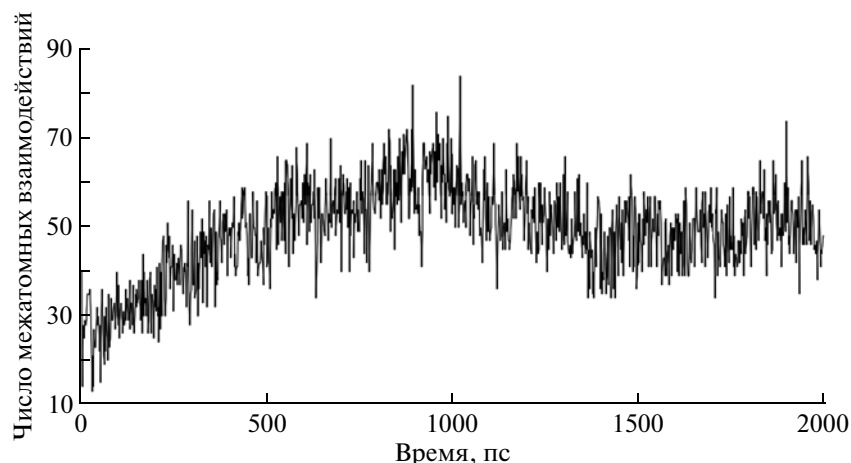


Рис. 4. Изменение общего числа межзатомных нековалентных взаимодействий ДНК и аниона линолевой кислоты со временем.

тура нейтрального комплекса; это связано с отталкиванием отрицательно заряженного кислорода карбоксильной группы Е1С и кислорода фосфатной группы ДНК. Однако в ходе молекулярной динамики количество межзатомных взаимодействий возрастает. Это, видимо, связано с тем, что система покидает локальный минимум и переходит в более выгодную конформацию (рис. 4). Аналогичная ситуация наблюдается для траектории молекулярной динамики линолевой кислоты.

Свободная энергия связывания олигонуклеотида и линолевой кислоты

Зависимость свободной энергии связывания линолевой кислоты с ДНК от координаты реакции, $A(\xi)$, дает величины энергии связывания в 8 ккал/моль для аниона линолевой кислоты и 13 ккал/моль для нейтральной молекулы (рисунок не приведен). Разница в величинах энергии связывания аниона и кислоты, вероятно, является следствием электростатического отталкивания между фосфатными группами сахара-фосфатного остова ДНК и СОО-группой жирной кислоты, в то время как в протонированной форме жирной кислоты водород СООН-группы способен образовывать водородную связь с кислородом фосфатной группы ДНК. Это значение совпадает со значением энергии связывания линолевой кислоты и декамера ДНК, полученным методом молекулярного докинга — 13.3 ккал/моль [7]. Рассчитанное ранее значение энергии связи ДНК и нейтральной формы линолевой кислоты для вакуума — 48 ккал/моль — сильно завышено [5]. Большое значение энергии связывания линолевой кислоты с ДНК сравнимо и даже превышает энергию связывания специфических лигандов, антибиотиков и противораковых препаратов [15].

Полученные результаты подтверждают возможность существования комплексов дуплекса ДНК и жирных кислот, в частности, с линолевой кислотой. Они касаются структуры и динамики таких комплексов в водной среде и находятся в согласии с предыдущими работами [7]. Комплекс нейтральной линолевой кислоты с ДНК более стабилен, чем комплекс аниона, на 5 ккал/моль. По-видимому, отрицательный заряд остова ДНК не является препятствием к существованию таких комплексов. Нейтральная форма линолевой кислоты образует с фосфатными группами ДНК водородную связь, что может влиять на стабильность дуплекса.

Авторы благодарят академика А.Р. Хохлова (МГУ им. М.В. Ломоносова), профессора П.Н. Дьячкова (ИОНХ им. Н.А. Курнакова РАН, Москва) и профессора Ф.К. Алимому (КФУ, Казань) за помощь в работе и обсуждение результатов.

Работа поддержана КФУ (грант Ф11-02), 2011 г., Минобрнауки РФ — КФУ (грант 2012–2014 гг., бюджет № 12-26 НД02), РФФИ (грант 12–03–97089-поволжье) и фондом А. фон Гумбольдта, Бонн, Германия (грант выдан Р.И. Жданову).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pindur U., Fischer G. // *Curr. Med. Chem.* 1996. P. 3379–3384.
2. Neidle S. // *Biopolymers.* 1997. P. 44105–44121.
3. Zhdanov R.I., Shmyrina A.S., Zarubina T.V., et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. V. 265. P. 151–158.
4. D'yachkov P.N., Fedorov B.B., Bischoff R., et al. // *Bioelectrochemistry.* 2002. V. 58. № 1. P. 47–51.
5. Жданов Р.И., Дьячков Е.П., Стручков В.А. и др. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2003. Т. 52. № 9. P. 1893–1899.
6. Жданов Р.И., Дьячков Е.П., Стражевская Н.Б. и др. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2005. Т. 54. № 9. С. 2138–2144.

7. Дьячков Е.П., Ибрагимова М.Я., Дьячков П.Н., Жданов Р.И. // Уч. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т. 153. Кн. 1. С. 86–96.
8. Manzoli F.A., Muchmore J.H., Bonora B., et al. // 1974. V. 340. № 1. P. 1–15.
9. Zhdanov R.I., Strazhevskaya N.B., Jdanov A.R., Bischoff G. // J. Biomol. Str. Dynamica. 2002. P. 231–241.
10. Kleywegt G.J. // Acta cryst. 2007. V. D63. P. 94–100.
11. Phillips J.C., Braun R., Wang W., et al. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1781–1802.
12. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., et al. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. P. 1157–1174.
13. Darve E., Rodríguez-Gómez D., Pohorille A. // J. Chem. Phys. 2008. V. 128. № 14. P. 144120.
14. Henin J., Forin G., Chipot C., Klein M.L. // J. Chem. Theor. Comput. 2010. V. 6. P. 35–47.
15. Dolenc J., Oostenbrink C., Koller J., et al. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 2. P. 725–733.