

•Фпротриниции и иниции hnnuluo hnnuluo в экспериментальные и теоретические статьи•

•Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК

Г.Р. ВАРДАПЕТЯН, Л.С. УНАНЯН

Российско-Армянский (Славянский) университет, Институт математики и высоких технологий hvardapetyan@mail.ru, lhunanyan@mail.ru

Методом молекулярной динамики изучено взаимодействие бромистого этидия (БЭ) с молекулой ДНК. Рассчитаны пространственные и энергетические параметры связывания ДНК-БЭ. Проведен сравнительный анализ экспериментально выявленных параметров связывания разными методами и параметров ММД.

ДНК – БЭ – константа связывания (К) – ММД

Ուսումնասիրված է բրոմական էթիդիումի (ԲԷ) և ԴՆԹ-ի մոլեկուլի փոխազդեցությունը՝ մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդի օգնությամբ։ Հաշվարկված են փոխազդեցության տարածական և էներգիական ցուցանիշները։ Կատարված է մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդի և այլ մեթոդների օգնությամբ ստացված տվյալների համեմատական վերլուծություն։

ԴՆԹ – ԲԷ – կապման հաստատուն (К) – ՄԴՄ

The interaction of ethidium bromide (EB) with the DNA by the method of molecular dynamics was studied. The geometric and energy parameters of DNA-ethidium bromide connectivity had been calculated. A comparative analysis of the experimentally identified connectivity parameters by different methods and parameters MMD had been carried out.

DNA – EB – connectivity constant (K) – MMD

Как известно, ДНК в клетке окружена молекулами различной природы и в процессе реализации биологических функций может образовать с этими соединениями комплексы различной природы. Из них наиболее важное значение имеют биологически активные природные соединения различной природы, а также лекарственные препараты. При этом возможны взаимодействия как ковалентным, так и нековалентными способами. В связи с этим, исследование способов и параметров связывания лигандов различной природы с ДНК является одной из важнейших задач современной молекулярной биологии. Исследование параметров связывания известными биофизическими и физикохимическими методами является достаточно трудоемким процессом, зависящим от чувствительности аппаратуры и условий эксперимента.

В основе методов молекулярной динамики (ММД) лежит модельное представление о многоатомной молекулярной системе, в которой все атомы представляют собой материальные точки [6, 7, 24]. Этот метод позволяет вычислить траектории как атомов, так и полимерных цепей. Также дает МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК

возможность исследовать динамику взаимодействия различных соединений друг с другом в разных пространственно-временных критериях: начиная с нескольких нанометров и на временных отрезках в несколько наносекунд [10, 23].

Целью настоящей работы являлось исследование взаимодействия бромистого этидия (БЭ) с ДНК методом молекулярной динамики.

БЭ – химическое соединение из группы фенантридинов (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиум бромид). Он широко используется как флуоресцентная метка для выявления ДНК [31], обладает мутагенными и канцерогенными свойствами [13, 32] и используется как химиотерапевтический агент [33].



Рис.1. Химическая структура БЭ.

Выбор БЭ обусловлен большим количеством исследований, в которых выявлены параметры и способы его связывания с ДНК. Определены доступные сайты, силы и константы связывания в зависимости от разных физико-химических параметров [1-5, 25, 27, 28].

Материал и методика. Для создания модели молекулы БЭ были использованы различные программы по биомоделированию. Были предусмотрены все параметры для низкомолекулярных соединений, получены силовые поля и сгенерирован топологический файл для БЭ с использованием программ по биомоделированию [12, 14, 21, 22, 29, 30].

Для моделирования взаимодействия был создан фрагмент двуцепочечного ДНК в соответствии с принятыми протоколами по биомоделированию [20], состоящий из 26 пар оснований со следующей последовательностью:

CCAGGTCGCAGTGACCTGCGGCAGTC

2	10	20	26

Для проведения эксперимента было создано пространство додекаэдерного типа с диаметром 176 A^0 , длиной ребра 74.54 A^0 и объемом 3173.75 нм³; количество воды и ионов составили 41277 мол.

Продолжительность времени комплексирования – 10 нс, процедура МД протекала с временным шагом $\Delta t = 2 \phi c$ при постоянной температуре T= 30⁰K и давлением в 1 атм.

Координаты всех атомов записывались каждые 2 пс. Расчетные критерии радиуса взаимодействия рассчитывались по стандарту: для кулоновских взаимодействий – 0.9нм, ван-дер-ваальсовских взаимодействий – 1.4 нм [15].

Для расчета энергии комплексообразования БЭ с ДНК – ΔG_{total} было использовано уравнение 1 [9, 18].

 $\Delta G_{total} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{el} + \Delta G_{pe} + \Delta G_{hvd} + \Delta G_{entr} , \qquad (1)$

где G_{vdw} – вклад ван-дер-ваальсовых взаимодействий (межмолекулярных и с водным окружением); ΔG_{el} – электростатический вклад; ΔG_{pe} – полиэлектролитный вклад; ΔG_{entr} – энергетический эффект изменения трансляционных ΔG_{tr} , ротационных ΔG_{rot} и вибрационных ΔG_{vibr} степеней свободы: Г.Р. ВАРДАПЕТЯН, Л.С. УНАНЯН

$$\Delta G_{entr} = \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vibr}, \qquad (2)$$

$$\Delta G_{hvd} = \cdot \Delta A \quad \gamma = 50 \ kal/(mol \cdot Å2), \tag{3}$$

где γ – микроскопический коэффициент поверхностного натяжения ($\gamma = 50$ кал/(моль·Å2).

Для определения константы связывания БЭ с ДНК было использовано следующее уравнение:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G_{total}}{RT}\right),\tag{4}$$

где ΔG_{total} – тотальная энергия взаимодействия, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, К – константа связывания.

Результаты и обсуждение. Для проведения симуляции взаимодействия БЭ с ДНК и выявления возможных сайтов связывания был использован метод "слепой способ", описывающий энергетически выгодные точки возможного взаимодействия [16, 17]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что число мест связывания на 26 пар равно 9. Это означает, что одна молекула БЭ в среднем приходится на 2.9 пар оснований. Были рассчитаны параметры конкретных сайтов связывания и процесса интеркаляции. Причем пространственная ориентация БЭ осуществлялась при 0^{0} и при 180^{0} относительно плоскости пар оснований.

В результате симуляции были получены пространственные и энергетические параметры процесса интеркаляции. Как предполагалось, молекула БЭ была встроена в плоскость между парами оснований, при этом дистанция между парами изменялась (параметры приведены в табл. 1).

Пространственная ориентация БЭ	$r(A^0)$	$\varphi(^0)$	$\theta(^{0})$
3'-5' ₀ ⁰	6.94-6.58	0.02	0.01
$3'-5'_{180}^{0}$	6.83-6.69	0.03	0.02
Сред.квадр. откл. от оси ДНК 00	0.046	0	0
Сред.квадр. откл. от оси ДНК 180 ⁰	0.050	0	0

Табл. 1. Пространственные параметры интеркаляции (*r* – дистанция, *φ* – угол взаимодействия, *θ* – торсионный угол взаимодействия).

Табл. 2.	Энергетические	параметры	интеркаляции
----------	----------------	-----------	--------------

			Межмолекулярные	Межмолекулярные
N	Пространственная	Взаимодействие,	внутри радиуса	вне радиуса
19	ориентация БЭ	КДж/моль	(SR – короткая	(LR – длинная
			дистанция)	дистанция)
1	00	Кулоновские	-40	-
1.	0	Ван-дер-Ваальс	-163	- 6.10
2	1800	Кулоновские	-47	-
∠.	100	Ван-дер-Ваальс	-165	-6.12

Из табл. 1 и 2 видно, что при интеркаляции пространственная ориентация молекулы почти не влияет на основные параметры этого процесса.

Используя уравнение (1), была рассчитана тотальная энергия взаимодействия, что составило -6.1 Ккал/моль.

Для выявления параметров взаимодействия важным критерием является и константа связывания лиганда на макромолекуле. С использованием уравнения (4) была получена константа связывания БЭ на молекуле ДНК К = 99.7 \cdot 10⁴ M⁻¹, что согласуется с литературными данными [3, 4, 8, 11, 19, 26].

В табл. 3 приведены константы связывания (К) и число пар оснований, с которыми связывается одна молекула лиганда (n), полученные методами абсорбционной спектроскопии [8, 11, 26], флюоресцентой спектроскопии [11, 26], методом магнитного пинцета [19] и результаты, полученные с помощью ММД.

Табл. 3. Сравнительные параметры К и п, полученные разными методами

N	Параметры	Экспериментально			ммп
IN		[8, 11, 26]	[11, 26]	[19]	милид
1.	Константа связывания (К)	$112 \cdot 10^{4}$	$130 \cdot 10^{4}$	$130 \cdot 10^{4}$	$99.7 \cdot 10^4$
2.	Число пар оснований (n)	≈ 2.4	≈3.0	≈ 1.9	≈ 2.9

Наряду с вышеперечисленными методами, ММД может использоваться для выявления и расчета типов и параметров связывания как биологически активных природных соединений различной природы, так и лекарственных препаратов с клеточными структурами.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Вардеванян П.О., Карапетян Р. А. и др., Конкурентность связывания бромистого этидия и Hoechst 33258 с ДНК// НАНАД, 107, 2, с. 193-198, 2007.
- 2. Вардеванян П.О., Антонян А.П и др. Особенности связывания EtBr и HOECHST 33258 с ДНК различного GC-содержания, Биолог. журн. Армении, 61, 2, с.21-26, 2009.
- 3. Вардеванян П.О., Антонян А.П. Изучение комплексов ДНК с лигандами различной природы, Биол. журн. Арм., 62, 3, с. 50-58, 2010.
- 4. Вардеванян П.О., Карапетян Р. А. и др. Взаимодействие нековалентно связывающихся лигандов с ДНК, НАНАД, 111, 4, с. 352-358, 2010.
- 5. *Карапетян А.Т.,Вардеванян П.О. и др.* Влияние двух способов связывания лигандов на параметры перехода спираль-клубок, Биополимеры и Клетка, *5*, 5, с. 38-43, 1989.
- 6. Шноль Э.Э., Гривцов А.Г. и.др., Метод молекулярной динамики в физической химии, М., Наука, 1996.
- 7. Allen M.P., Tildesley D.J., Computer Simulation of Liquids, Oxford: Clarendon Press, 2002.
- Arakelyan V.B., Sarkisyan G.S. et al. The analysis of experimental data of DNA EtBr complexes within the rangies of low fillings. Int. conf & DAAD Alumni seminar "Biotechnology and Health-2", pp 10-15,2008.
- 9. Chaires J.B. Energetics of Drug–DNA Interactions. Biopolymers, 44, p. 201–215, 1997.
- 10. Cheng H.-P. Cluster-surface collisions: Characteristics of Xe55- and C20-Si[111] surface bombardment, J. Chem. Phys., 111, 16, p. 7583-7592, 1999.
- 11. Chitre A.V., Korgankar K.S. Binding of Ethidium Bromide and Quinacrine Hydrochloride to Nucleic Acids and Reconstituted Nucleohistones, Biochem. J., 179, p. 213-219, 1979.
- 12. Da Silva S., Vranken A., Laue W. ACPYPE AnteChamber PYthon Parser interface E. Manuscript to be submitted.
- Hajduk, S.L. in Progress in Molecular and Subcellular Biology, Springer-Verlag, 6, p. 158-200, 1978.
- Hess B., Kutzner C., Van der Spoel D., Lindah L. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. E. J. Chem. Theory Comput, 4, p. 435-447, 2008.
- Hornak V., Abel R., et al. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 65, p. 712–725, 2006.

Г.Р. ВАРДАПЕТЯН, Л.С. УНАНЯН

- 16. http://autodock.scripps.edu/resources/adt.
- 17. http://vina.scripps.edu/.
- 18. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. Quarterly Reviews of Biophysics, *33*, 3, p. 255–306, 2000.
- Lipfert J, Klijnhout S, Dekker N.H. Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers, Nucleic Acids Res., 38, 20, p.7122-7132, 2010.
- Macke T., Svrcek-Seiler W.A. et al. Generation of Models for "Unusual" DNA and RNA: A Computer Language for Structural Exploration Updated, 2012.
- 21. Marvin /Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin 5.8.0, ChemAxon (http://www.chemaxon.com), 2012.
- Pettersen E., Goddard T., Huang C., et al. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput Chem., 25, 13, p.1605-1612, 2004.
- 23. *Qi L., Young W. L., Sinnott S. B.* Effect of surface reactivity on the nucleation of hydrocarbon thin 'Im through molecular-cluster beam deposition. Surf. Sci. *426*, p. 83, 1999.
- Stillinger 1999. F.H., Weber Th. A. Computer simulation of local order in condensed phases of silicon Phys. Rev. B., 31, 8. p. 5262-5271, 1985.
- Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., et al. Some Aspects of DNA-EtBr Interaction Pequliarities. Advances in Gene Technology: The Genome and Beyond – Structural Biology for Medicine (Proceedings of the 2002 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium) The Scientific World, 2, S2, p.144-145, 2002.
- Vardevanyan P.O., Antonyan A.P. et al. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures, exp. and mol. medicine, 35, 6, pp. 527-533, 2003.
- Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., et al., Complex-formation of Ethidium Bromide with poly[d(A-T)].poly[d(A-T), J. Biomol. Struct. Dyn., 22, 4, p.465-470, 2005.
- Vardevanyan P.O. Karapetyan R.A. et al. Pequliarities of complex-formation of Ethidium bromide and Hoechst 33258 with DNA under influence of non termal electromagnetic millimeter waves, Biolog. Jour. of Armenia, 64, 3, p.102-108, 2012.
- 29. Wang J., Wolf R., Caldwell J., et al., Development and testing of a general AMBER force field. J. of Comput. Chem., 25, p. 1157-1174, 2004
- 30. Wang J., Wang W., Kollman P., Case D. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, J. of Mol. Graph. and Mod., 25, pp. 247-260, 2006
- 31. *Waring, M. J.*, Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, J. Mol. Biol. *13*, p. 269-282, 1965.
- 32. Waring, M.J. DNA modification and cancer, Annu. Rev. Biochem., 50, p. 159-191, 1981.
- 33. *Wilson, W.D., Jones, R.L.* in Advances in Pharmacology and Chemotherapy, Academic, *18*, p. 117-222, 1981.

Поступила 10.04.2013