

## МОДЕЛИРОВАНИЕ СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛАВИН-МОНО- НУКЛЕОТИДА С АЗОТИСТЫМИ ОСНОВАНИЯМИ ДНК

Мухина Ю.В.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Россия, 299053; e-mail: onica@rambler.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

**Аннотация.** Исследован механизм взаимодействия флавин-моноклеотида (FMN) с азотистыми основаниями ДНК и с фрагментом ДНК. Полу- и неэмпирическими методами рассчитаны наиболее вероятные структуры комплексов FMN с основаниями, с парами оснований и с фрагментом ДНК. Определены структурные и термодинамические параметры комплексов FMN с парами оснований ДНК. Установлен вклад различных физико-химических сил взаимодействия в стабилизацию комплексов молекул. Сделаны выводы о молекулярном механизме взаимодействия FMN с основаниями ДНК.

**Ключевые слова:** флавин-моноклеотид, азотистые основания ДНК, полу- и неэмпирические методы, дисперсионное взаимодействие, интеркаляция.

В результате проведенных ранее исследований относительно механизмов медико-биологического действия ароматического витамина рибофлавина (RBF) и его производных (FMN и FAD), а так же его взаимодействия с ДНК, белками и ферментами клетки, выполненных различными методами, было предложено несколько возможных молекулярных механизмов, приводящих к проявлению биологического действия витамина. Так основной медико-биологический механизм воздействия FMN на функционирование клеток - участие в метаболизме в качестве кофермента в реакциях окисления и восстановления. Однако существует ряд свидетельств и о другом механизме действия: образование нековалентных гетерокомплексов с последующей в некоторых случаях химической деградацией БАС, а также конкурентное связывание с ДНК и флавоэнзимами. Известно об образовании комплексов между производными рибофлавина – FMN и FAD – с белком [1], о способности рибофлавина, в качестве простетических групп, образовывать устойчивые комплексы с апоферментами за счет гидрофобных или  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий между двумя идентичными ароматическими кольцами [2]. Было показано, что изоаллоксазоновый хромофор RBF способен встраиваться между параллельными плоскостями ароматических колец аминокислот тирозина и триптофана при его связывании с апоферментом куриного яичного белка [3]. Таким образом, можно предположить, что RBF способен взаимодействовать с ДНК по типу интеркаляционного или частично интеркаляционного связывания, и, следовательно, может являться конкурентом другим ароматическим лигандам за сайт связывания с рецепторами – ДНК и РНК в клетке.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проведено исследование структурных и термодинамических особенностей комплексов витамина с азотистыми основаниями ДНК методом молекулярной механики, полу- и неэмпирическими методами, с использованием теории возмущений Меллера-Плессета второго порядка (MP2). Расчет пространственных структур комплексов был выполнен при помощи программ HyperChem и X-PLOR, водное окружение моделировали молекулами воды ТРЗР, размещенными в кубическом боксе с ребром 35 Å, содержащем 1235 молекул воды. После чего, координаты атомов молекул в комплексах были использованы в качестве начального приближения для расчета точного распределения зарядовой плотности, дипольного момента, термодинамических параметров и оптимизации геометрических характеристик комплексов в вакууме с использованием программы неэмпирического расчета Gaussian 03W.

Для построения комплекса витамин - пара оснований использовалась прооптимизированная ранее структура молекулы FMN, структуры Уотсон-Криковских пар оснований (AT и GC) были взяты из банка данных кристаллической структуры ДНК В-формы.

Расчет ассоциатов FMN·(AT), FMN·(GC) был проведен исходя из идеализированной начальной геометрии: интеркалятор и пара оснований располагалась в параллельных плоскостях, отстоящих на расстоянии 3,4 Å, при этом главные оси систем были параллельны. В процессе расчета проводилась оптимизация полуэмпирическим методом вертикального расстояния между взаимодействующими молекулами, угла твист главных осей систем и смещения в плоскостях.

После получения оптимизированных комплексов был проведен расчет стабилизационной энергии взаимодействия методом MP2 с использованием базиса 6-31G\* с диффузной функцией. Данный базис достаточно хорошо разработан для изучения образования стэкинг-кластеров, при этом диффузная d-функция важна для правильного описания атомов и слабых связей (например, водородных связей), для вычисления дипольного момента, поляризуемости и т.п. Это гауссианы с очень малыми экспонентами, медленно спадающими с увеличением расстояния от ядра. Диффузный гауссиан имеет обычно s- и p-тип, однако используются и другие диффузные функции. Установлено, что использование d-функции качественно

улучшает значение межмолекулярной корреляционной (дисперсионной) энергии. Это весьма существенно, поскольку известно, что дисперсионная энергия доминирует во вкладе в стабилизацию стэкинг-комплекса пар оснований и, как следствие, возможно обеспечивает основной вклад в стабилизацию интеркалятора в ДНК. Используемый для расчета неэмпирический метод MP2, основанный на теории функционала плотности, достаточно хорошо описывает не только электростатическую, поляризационную (индукционную) и дисперсионную энергии, но так же и эффект обмена зарядом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день известно, что при образовании интеркаляционного комплекса помимо вклада от дисперсионного (если ароматические полициклические системы обладают высокой поляризуемостью) и электростатического (при условии, что интеркалятор – высоко полярная или заряженная система) взаимодействий может давать вклад в стабилизацию комплекса так называемый «перенос заряда», если одна из взаимодействующих систем является хорошим электронным донором, другая – электронным акцептором. Charge-transfer комплекс определяется как донорно-акцепторный комплекс, характеризуемый электронным переходом в возбужденное состояние, в котором наблюдается частичный переход заряда от донора на акцептор. С целью установления являются ли исследуемые молекулы донорами или акцепторами электронов был произведен расчет энергий наивысшей занятой (HOMO – highest occupied molecular orbital) и наинизшей незанятой (LUMO – lowest unoccupied molecular orbital) молекулярных орбиталей.

Полученные значения энергий HOMO и LUMO (табл. 1) свидетельствуют о том, что основания ДНК являются хорошими электронными донорами, лучшим среди которых является гуанин, при этом, малая энергия LUMO для молекулы FMN, по сравнению с азотистыми основаниями, указывает на то, что FMN является акцептором электронов. Сделанный вывод свидетельствует о возможности дополнительной стабилизации стэкинг-ассоциата FMN-основание за счет обмена зарядом в донорно-акцепторном комплексе.

Произведенный расчет дипольных моментов (табл. 2) всех исследуемых в работе молекул и распределения атомарного заряда на них, после оптимизации геометрических характеристик, позволил предположить возможную ориентацию хромофоров флавин-моноклеотида и азотистых оснований в комплексах, учитывая взаимодействие электрических диполей.

В результате проведенных расчетов структур комплексов, используя различные стартовые конфигурации, при минимизации потенциальной энергии молекулярной системы получено значительное количество структур с различными конформационными параметрами. Далее был проведен отбор низкоэнергетических структур, причем, необходимо отметить, что геометрия таких оптимизированных структур в большинстве случаев была мало чувствительна к условиям внешней среды, так что введение водного окружения несущественно изменяет конформацию комплекса в сравнении со структурами, полученными в вакууме.

Полученные координаты атомов молекул в комплексе с использованием метода молекулярной механики были использованы в качестве начального приближения для оптимизации геометрических характеристик молекул в вакууме и для дальнейшего расчета энергетических характеристик, дипольного момента с использованием программы неэмпирического расчета Gaussian 03W.

При оптимизации структур была осуществлена минимизация общей потенциальной энергии молекулярных систем, при этом определены энергетические параметры с помощью неэмпирического метода HF, результаты расчетов представлены в таблице 3.

**Таблица 1.** Значения энергий HOMO и LUMO для азотистых оснований и FMN

Молекула	EHOMO, эВ	ELUMO, эВ
ADE	-8,64	3,25
THY	-9,48	2,30
GUA	-8,27	3,72
CYT	-9,24	2,84
FMN	-8,41	0,33

**Таблица 2.** Дипольный момент молекул в проекциях на оси координат и общий дипольный момент D, дебай

Молекула	Dx	Dy	Dz	D
ADE	-1,86	1,79	0	2,58
THY	-4,19	-3,20	0	5,27
GUA	3,31	-6,71	0	7,49
CYT	5,48	-5,82	0	7,99
FMN	-5,09	10,09	-0,37	11,31

Таблица 3. Энергетические параметры молекулярных систем\*

Система	- Etotal, ккал/моль	- H, ккал/моль	D, дебай
FMN-ADE	165826	35	5
FMN-GUA	172566	43	10
FMN-CYT	162362	71	11
FMN-THY	168483	118	9

\*Примечание: Представленные параметры можно использовать только для сравнения с системами, рассчитанными тем же методом

Полученные приблизительно одинаковые значения для полной энергии, согласуются со схожей пространственной геометрией комплексов (рис. 1), при этом, более низкая энергия для системы FMN-GUA, возможно связана с максимальным перекрытием колец молекул в данном ассоциате, как следствие большего вклада от дисперсионного взаимодействия, а также большего вклада в общую стабилизационную энергию от эффекта обмена зарядом ввиду того, что GUA по сравнению с другими азотистыми основаниями обладает более выраженными электронно-донорными свойствами.

Отрицательные значения теплоты образования комплексов свидетельствуют об экзотермическом характере ассоциации, следовательно, процесс комплексообразования является термодинамически выгодным.

Анализ полученных пространственных структур комплексов FMN-ADE, FMN-GUA, FMN-CYT и FMN-THY, соответствующих минимальной потенциальной энергии, позволяет сделать следующие выводы: полученные низкоэнергетические структуры для всех 4 исследованных комплексов соответствуют противоположной ориентации электрических диполей, что в свою очередь, согласуется с равновесной ориентацией диполей в пространстве; все ассоциаты характеризуются параллельным расположением хромофоров взаимодействующих молекул, отстоящих друг от друга на расстоянии 3,4 Å, что свидетельствует о преобладающем дисперсионном взаимодействии ароматических (и частично ароматических) систем.

Отрицательные значения теплоты образования комплексов свидетельствуют об экзотермическом характере ассоциации, а следовательно, процесс комплексообразования является термодинамически выгодным.

**Анализ структуры комплекса FMN – пара оснований ДНК.** Для построения комплекса витамин - пара оснований использовалась прооптимизированная ранее структура молекулы FMN, структуры Уотсон-Криковских пар оснований (АТ и GC) были взяты из банка данных кристаллической структуры ДНК В-формы. С целью проведения детального анализа структур образующихся комплексов в работе была исследована зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от вертикального расстояния между взаимодействующими системами в области от 3,2 до 3,6 Å и более детально в области 3,3-3,4 Å. Полученные структуры комплексов представлены на рисунке 2 и соответствующие примененному методу расчета значения энергии стэкинг-взаимодействия E представлены в таблице 4.

На рисунках 3 и 4 представлены 3 кривые зависимости энергии стэкинг-взаимодействия, полученные при изменении расстояния между FMN и парой оснований с помощью MP2, HF и B3LYP расчетных методов. Как видно, MP2 и B3LYP методы позволяют достаточно точно описать поведение энергии взаимодействия от расстояния и имеют схожий вид с выявлением минимума на потенциальной кривой, соответствующий расстоянию 3,38 Å, которое практически совпадает с равновесным расстоянием в комплексе ароматических систем в кристалле.

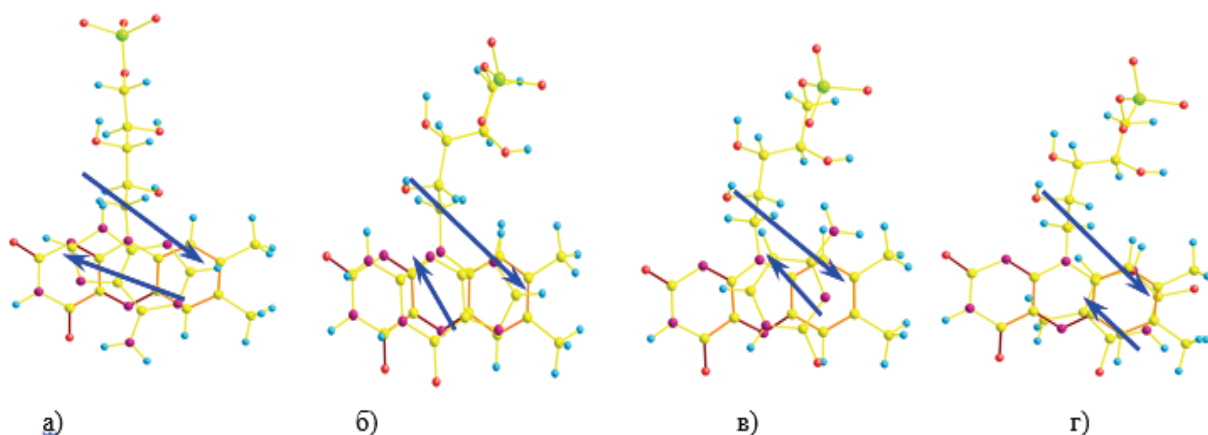


Рисунок 1. Расчетные структуры 1:1 комплексов с указанием диполей взаимодействующих молекул: а) FMN-аденин, б) FMN-гуанин, в) FMN-цитозин, г) FMN-тимин

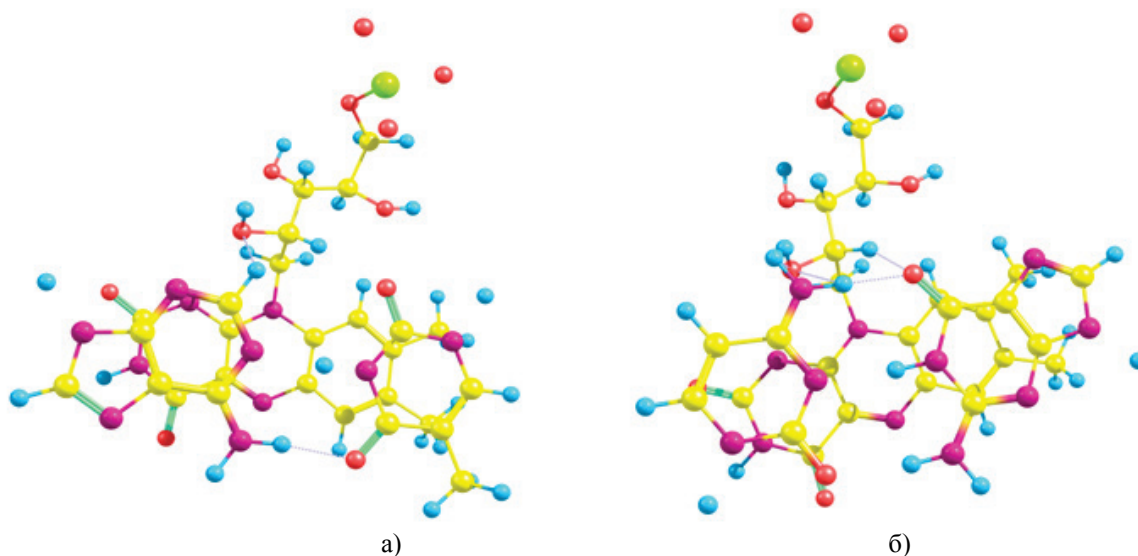


Рисунок 2. Структуры комплексов: а) FMN-AT, б) FMN-GC

Таблица 4. Энергия стэкинг-взаимодействия E, ккал/моль

Метод	MP2, -E, ккал/ моль		B3LYP, -E, ккал/моль		HF, -E, ккал/ моль	
	FMN-AT	FMN-GC	FMN-AT	FMN-GC	FMN-AT	FMN-GC
Расстояние, г, Å						
3,20	15,87	14,97	16,15	14	0,13	0,87
3,30	16,92	15,83	16,92	14,5	1,25	1,46
3,38	18,10	18,28	17,30	15,36	1,27	1,47
3,40	17,99	18,20	17,23	15,33	1,27	1,47
3,50	17,11	17,32	17,08	15,0	1,5	2,5
3,60	16,25	16,0	15,7	13,72	4,0	3,7

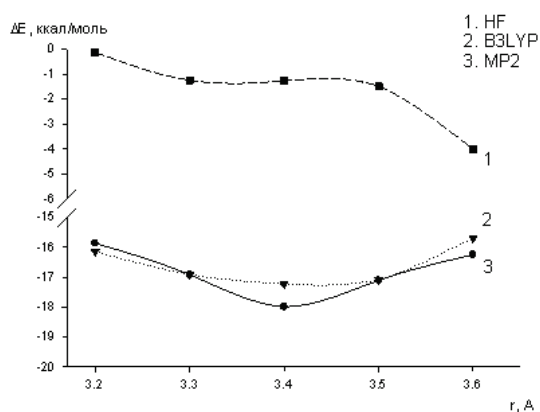


Рисунок 3. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от расстояния FMN-AT

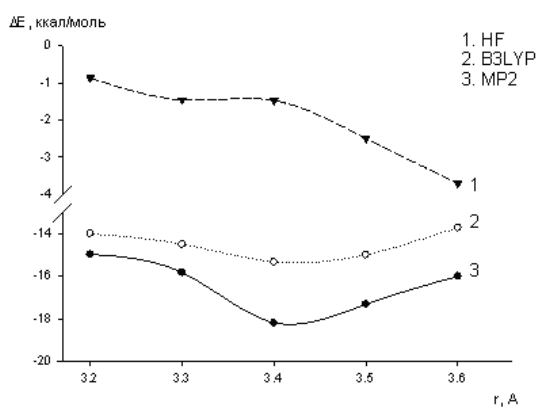


Рисунок 4. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от расстояния FMN-GC

Метод HF позволяет получить отличную от описанных выше методов форму потенциальной кривой, которая при этом не имеет выраженного минимума, что, в свою очередь, указывает на ограничение использования данного метода для точного описания интеркаляционного процесса.

Ситуация с ассоциатом FMN·-(GC) парой, как видно из рис. 4, является схожей, некоторое отличие в энергиях взаимодействия обусловлено различием энергии образования AT и GC пар, поскольку структура их комплексов с FMN аналогична.

Известно, что интеркалятор может занимать различные ориентации по отношению к соседней паре оснований в сайте связывания. Некоторые молекулы встраиваются перпендикулярно паре оснований, при этом часть молекулы располагается в канавке, в то время как другие располагаются вдоль C4-C2 оси пары оснований. Известно, что ориентация интеркалятора определяется как электростатическими силами, так и стерическими эффектами, поскольку данные ароматические молекулы часто имеют громоздкие боковые группы.

Таким образом, далее в работе был проведен расчет зависимости энергии стэкинг-взаимодействия (E) от угла твист в образуемых комплексах с использованием тех же методов, какие были выбраны для расчета зависимости энергии от вертикального расстояния.

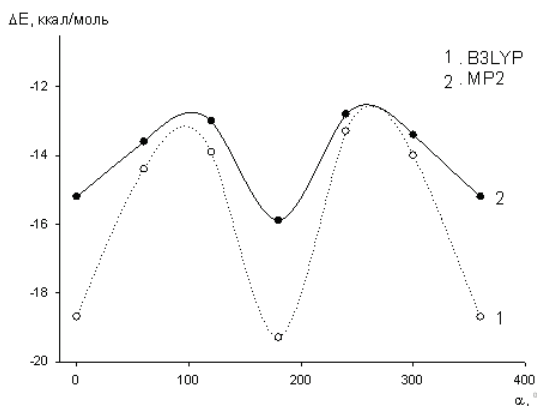
При расчете была задана начальная ориентация таким образом, чтобы ось молекулы витамина C13-C2 была параллельна оси пары оснований C4-C2, при этом центры масс пары оснований и ароматического хромофора витамина располагались друг под другом. Вертикальная дистанция была задана 3,38 Å, соответствующая минимуму на потенциальной кривой, при этом две взаимодействующие системы располагались копланарно. Начиная с указанной исходной геометрии в дальнейших расчетах производился поворот (скручивание) взаимодействующих систем вдоль оси димера интеркалятор – пара оснований, проходящей вдоль центра масс обеих подсистем. Начальная геометрия соответствовала углу твист 0°, расчет зависимости энергии стэкинг-взаимодействия от угла проводился во всей области от 0° до 360° с шагом 60°. Полученные результаты представлены в таблице 5.

На рисунках 5 и 6 представлены зависимости энергии от угла поворота, полученные с использованием MP2 и B3LYP методов для двух исследуемых комплексов.

Анализ зависимостей позволяет сделать вывод, что энергия стэкинг-взаимодействия в значительной степени зависит от угла интеркаляции ароматической молекулы и претерпевает изменение в 5 ккал/моль при повороте молекулы. Полученный вид зависимости указывает на существенный вклад дисперсионного взаимодействия, которое пропорционально геометрическому перекрытию ароматических систем.

**Таблица 5.** Зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от угла поворота

Метод	MP2		B3LYP	
	-E, ккал/моль		-E, ккал/моль	
Угол, α, °	FMN-AT	FMN-GC	FMN-AT	FMN-GC
0°	18,1	18,28	17,3	15,3
60°	16,2	13,6	15	14,4
120°	15,03	13	14,6	13,9
180°	19,2	15,9	20,2	19,3
240°	15,0	12,8	14,3	13,3
300°	15,87	13,4	14,7	14
360°	18,1	18,28	17,3	15,3



**Рисунок 5.** Зависимость энергии от угла поворота для FMN-AT пары

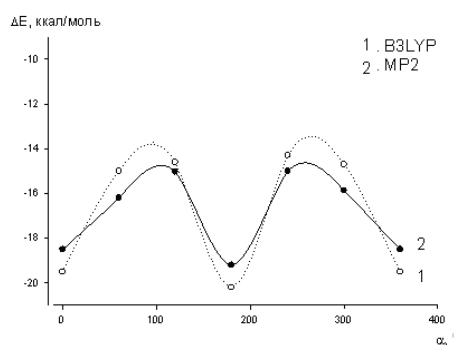


Рисунок 6. Зависимость энергии от угла поворота для FMN -GC пары

Видно, что как и в предыдущих расчетах, MP2 и B3LYP методы достаточно однозначно описывают поведение энергии в зависимости от угла взаимного поворота осей взаимодействующих систем, а метод HF (на рисунках 5, 6 не представлен), не учитывающий корректно дисперсионный вклад в общую энергию, не позволяет адекватно описать поведение потенциальной кривой.

Полученные зависимости энергии стабилизации  $E$  от расстояния и угла скручивания свидетельствуют о значительном вкладе дисперсионной энергии в стабилизацию исследуемых комплексов.

**Расчет интеркаляционного комплекса FMN – динуклеотид ДНК.** Для корректного теоретического описания FMN – ДНК комплекса необходимо применять ab-initio квантово-механический подход. Однако размер ассоциата ДНК - интеркалятор обычно ограничивает использование квантово-механических методов и приводит к необходимости использования эмпирического метода молекулярной механики. Этот метод не содержит индукционного вклада и эффекта обмена зарядом, также неточно ведет расчет дисперсионной энергии, однако возможно произвести приближенный расчет стабилизационной энергии.

В данной работе метод молекулярной механики применялся лишь для получения начального приближения геометрии комплексов FMN-d(AA), FMN-d(GG), FMN-d(AG), для построения которых использовалась оптимизированная ранее структура молекулы витамина, динуклеотидный сайт двойной спирали ДНК В-формы был взят из кристаллической базы данных.

После получения начального приближения более точный расчет структуры проводился с использованием полуэмпирического метода AM1, при этом полученная геометрия комплекса была использована в дальнейших расчетах неэмпирическим методом MP2 с целью учета всех вкладов в энергию взаимодействия.

В работе была выбрана минимальная модель - динуклеотидный сайт связывания с целью возможности проведения расчета высоко точным методом MP2, при этом данная минимальная модель сайта связывания позволяет провести всесторонний анализ интеркаляционного комплекса.

При расчете оба фосфатных остатка были протонированы с целью уменьшить электростатический заряд фосфатной группы аналогично присутствию положительно заряженных противоионов натрия.

На рисунке 7 представлены полученные структуры комплексов с минимальной потенциальной энергией.

Стабилизационная энергия была определена как разность энергий комплекса молекул и его компонент и представлена в таблице 6.

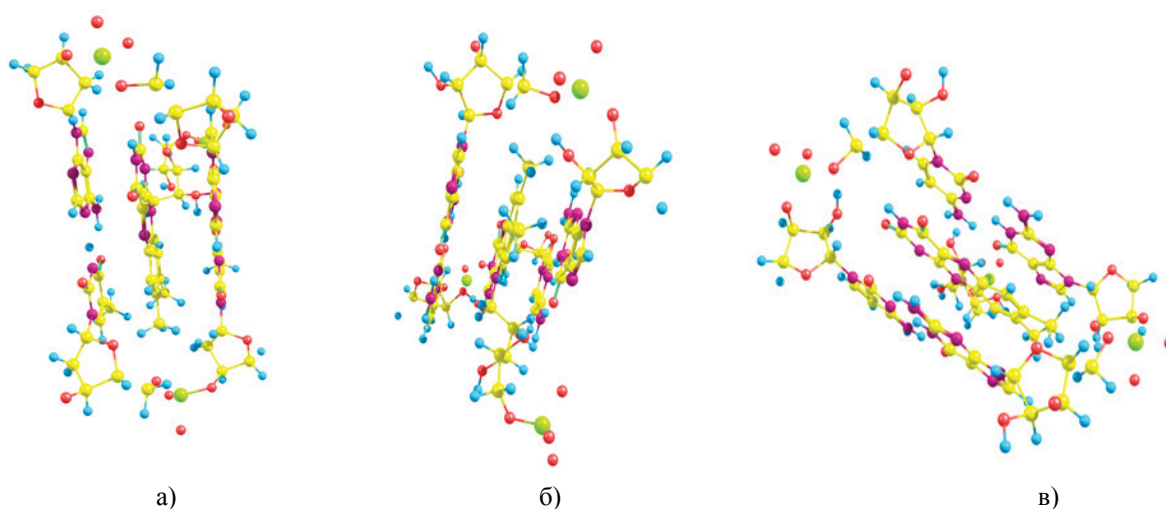


Рисунок 7. Структуры комплексов а) FMN-AA, б) FMN-GG, в) FMN-AG

Таблица 6. Стабилизационная энергия комплексов FMN – d(AA), FMN – d(GG), FMN – (AG)

Комплекс	Метод	MP2	B3LYP	HF
		$\Delta E$ , ккал/ моль	$\Delta E$ , ккал/ моль	$\Delta E$ , ккал/ моль
FMN-d(AA)		-38,5	10,7	7,6
FMN-d(GG)		-37,1	11,2	4,2
FMN-(AG)		-36,7	12,0	1,8

Анализ полученных значений энергий взаимодействия полностью подтверждает сделанный ранее вывод о специфике выбора расчетного метода в соответствии поставленной задаче. Так метод функционала плотности MP2 наиболее точно произвел расчет стабилизационной энергии, в отличие от методов HF и B3LYP, что подтверждает нежелательное использование данных методов для описания процессов, включающих дисперсионное взаимодействие.

Расчетные структуры комплексов интеркалятор – динуклеотидный сайт ДНК (рис. 7) свидетельствуют о схожем характере интеркаляции ароматического хромофора молекулы FMN: так все полученные комплексы характеризуются копланарным расположением пар оснований и FMN на расстоянии 3,8Å. При таком расположении достигается минимальная стабилизационная энергия ввиду максимального перекрытия ароматических систем и, как следствие, максимального вклада дисперсионных сил взаимодействия в стабилизацию комплекса.

Был также произведен расчет энергии при различном угле твист между главными осями взаимодействующих систем, при этом наблюдалось значительное увеличение энергии на 9 ккал/моль при изменении угла на 30°. Однако, ввиду наличия у молекулы FMN достаточно массивной боковой цепи расчет проводился в области от -60° до 60°, при этом минимум на потенциальной кривой энергии достигался при 20° между осями соседних пар оснований и FMN. При этом боковая цепь молекулы FMN, которая из-за наличия заряда является гидрофильной, ориентирована по центру большой канавки и таким образом возможно ее взаимодействие с молекулами воды.

Все полученные структуры характеризуются раздвижением пар оснований до расстояния 6,5 Å. Конечный комплекс становится более жестким, при этом как ДНК, так и интеркалятор теряют свою трансляционную и вращательную степени свободы.

#### Список литературы / References:

1. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer. *Eur. Biophys. J.*, 2001, vol. 30, pp. 354-366.
2. Lubas B., Soltysik M. Proton NMR study of the interaction of riboflavin with the egg-yolk apoprotein. *FEBS Letters.*, 1977, vol. 79, no. 1, pp. 179-182.
3. Monaco H.L. Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, no. 7, pp. 1475-1483.

### MODELING the STACKING INTERACTIONS of FLAVIN-MONONUCLEOTIDE WITH the NITROGENOUS BASES of DNA

Mukhina U.V.

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053; e-mail: onica@rambler.ru

**Abstract.** The mechanism of the interaction flavin-mononucleotide (FMN) with bases DNA and with fragment DNA were explored. The most probable structures complex FMN with bases, with pair of the bases and with fragment DNA have been calculated by means of semi- and nonempirical methods. Structures and thermodynamic parameters of complex FMN with pair of the bases DNA have been determined. The contribution of different physical-chemical forces of the interaction in stabilization complexes of molecules has been installed. Conclusion about molecular mechanism of the interaction FMN with bases DNA has been made.

**Key words:** flavin-mononucleotide, bases DNK, semi- and nonempirical methods, dispersion interaction, intercalation.