

Ж-14038
П 327667

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Вісник Харківського університету № 488

Біофізичний Вісник



1'00

Biophysical Bulletin

2000

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направленням установи і експертним висновком. Рукописи, які подаються до редакції, повинні точно відповідати наступним вимогам.

Текст друкується на білих аркушах формату А4, через один інтервал, з високою якістю друку, придатною для фотокопіювання (рекомендується лазерний або струйний принтер). Використовується редактор MS Word, шрифт Times New Roman (Сут), розмір шрифту 10 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем.

Математичні та хімічні символи, рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою комп'ютерної техніки. Рисунки, у вигляді повністю придатному до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки виготовляються з використанням комп'ютерної техніки або виконуються тушшю на білому папері з друкованими цифрами і буквами на осях. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 9 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

Послідовність розміщення матеріалу:

На першій сторінці зверху пропускаються два рядки; на третьому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 9 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 9 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкується за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число-цифра, місяць-прописом, рік-цифра (шрифт прямий, 9 pt., вирівнювання по центру).

Після пропуску одного рядка вміщується реферат статті, не менше 6 і не більше 12 рядків, з коротким викладом об'єкту дослідження, мети або задач, методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів і висновків. Слово "реферат" не пишеться (для тексту реферату використовується прямий шрифт розміром 9 pt.).

На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів (9 pt., заголовок "КЛЮЧОВІ СЛОВА:" пишеться прописом на тому ж рядку, що й ключові слова і виділяється напівжирним шрифтом).

Текст реферату і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку).

Потім, після пропуску одного рядка, вміщується основний текст статті. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ**, **ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ**, **МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються (в назвах розділів усі букви прописні і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу іде один пустий рядок. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться.

У кінці тексту статті, після пропуску одного рядка, якщо необхідно, зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту.

Використані в роботі літературні джерела нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи. Список літератури (шрифт 9 pt.) розміщується одразу за основним текстом статті й виділяється як розділ.

На окремому аркуші з полями справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см до статті додається реферат англійською мовою. Слово "Abstract" не пишеться. Назва статті: прописом, шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру. На наступному рядку - ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру). На наступному рядку друкується повна назва організації та її адреса (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка вміщується текст реферату (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині, без червоного рядка). На наступному рядку після слів "KEY WORDS:" (прописом, шрифт прямий напівжирний, 9 pt.) вміщуються ключові слова (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині).

Для статей написаних англійською мовою, крім окремого реферату англійською мовою, у кінці статті, після списку літератури наводиться реферат українською мовою за тими ж правилами.

Зверніть увагу на компактне викладення матеріалу статті, бо друкування журналу здійснюється на підставі самофінансування.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету
№ 488, 2000

БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК

Заснований у 1998 році

випуск 1(6)

Харків
2000

Від редакції:

Шановні читачі та автори !

Випуск журналу "БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" є новою серією "Вісника Харківського університету" (ISSN 0453-8048). Періодичність журналу – від двох до чотирьох разів на рік у залежності від набору матеріалу.

"БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" публікує огляди, статті та короткі повідомлення, які містять оригінальні результати вирішення фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної, теоретичної фізики та математичного моделювання. Журнал має традиційні для біофізики підрозділи: МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА, БІОФІЗИКА КЛІТИНИ, БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ, ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООБ'ЄКТИ, МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.

До публікації приймаються статті, що написані українською, російською чи англійською мовами згідно з правилами для авторів і мають позитивні рекомендації двох рецензентів, яких призначає редакція.

Журнал розрахований на науковців, викладачів вузів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики, чи цікавляться біофізичними проблемами.

Запрошуємо до плідного співробітництва!

Редакційна колегія

д.ф.-м.н., проф. Малєєв В.Я. – відповідальний редактор

д.ф.-м.н. Благой Ю.П.

д.б.н. Бондаренко В.А.

д.б.н. Гордієнко Є.О.

д.ф.-м.н. Казанський В.Б.

д.б.н. Кнігавко В.Г.

д.ф.-м.н. Осецький О.І.

д.б.н. Перський Є.Е.

д.ф.-м.н. Семенов М.О.

д.ф.-м.н. Сорокін В.О.

д.ф.-м.н. Товстяк В.В.

д.ф.-м.н. Шкорбатов О.Г.

Відповідальний секретар: к.б.н., доц. Гаташ С.В.

Адреса редакційної колегії: 61077, м. Харків, пл. Свободи, 4,

Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, радіофізичний факультет,
кафедра молекулярної та прикладної біофізики,

тел.: (0572)-457576, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

Друкується за рішенням вченої ради Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна
протокол № 6 від 30.06.00

© Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, 1998

© Гаташ С.В., 1998 – оформлення

ISSN 0453-8048

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE

Visnyk Kharkivskogo universytetu
№ 488, 2000

BIOPHYSICAL BULLETIN

Founded in 1998

Issue 1(6)

Kharkiv
2000

Dear readers and authors:

BIOPHYSICAL BULLETIN is a new series of *Visnyk* of V.N.Karazin Kharkiv National University. The periodicity of the journal varies from two to four times per year depending on the number of the papers submitted.

The journal publishes reviews, articles, and short communications, that contain original results of solution of physical and mathematical problems corresponding to biological systems of various levels of organization by using the methods of experimental and theoretical physics and biology and mathematical modelling. The journal contains sections, which are traditional for biophysics: MOLECULAR BIOPHYSICS, CELL BIOPHYSICS, BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS, ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS, METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS.

Contributions should be written in English, Ukrainian or Russian according to the Instructions for Authors and would be accepted for publication after the approval of two reviewers appointed by the editors.

You are welcome for fruitful cooperation !

Editorial Board

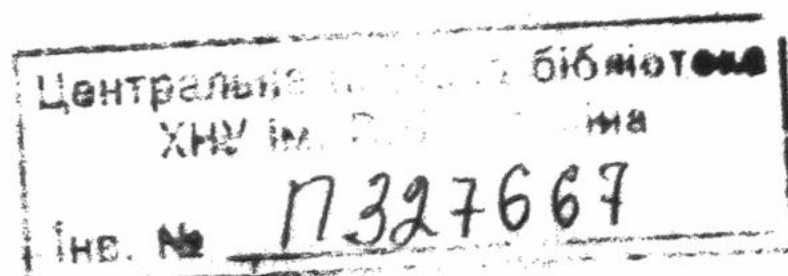
D.Sc., Prof. **Maleev V.Ya.** – *Editor-in-Chief*

D.Sc. **Blagoi, Yu.P.**
D.Sc. **Bondarenko, V.A.**
D.Sc. **Gordienko, Ye.A.**
D.Sc. **Kazanskiy, V.B.**
D.Sc. **Knigavko V.G.**
D.Sc. **Osetskiy A.I.**

D.Sc. **Perskiy Ye.Ye.**
D.Sc. **Semenov M.A.**
D.Sc. **Sorokin V.A.**
D.Sc. **Tovstiak, V.V.**
D.Sc. **Shkorbatov A.G.**

Executive Secretary: Ph.D., Assoc. Prof. **Gatash S.V.**

Address: Chair of Molecular and Applied Biophysics
Radio Physics Department
V.N.Karazin Kharkiv National University
4 Svobody Sq.,
61077, Kharkov, Ukraine,
phone: 38 0572 45 75 76, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua



ЗМІСТ • CONTENTS

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА • MOLECULAR BIOPHYSICS

- Danilov V.I., Slyusarchuk O.N., Stewart J.J., Alderfer J.L.** A theoretical study of the double-proton phototautomerism in 7-azaindole dimer 7
- Семенов М.А., Гасан А.И., Малеев В.Я., Больбух Т.В., Сагайдакова Н.Н., Круглова Е.Б., Веселков А.Н., Глибин Е.Н.** Физические механизмы взаимодействия производных актиноина с ДНК. 1. Влияние воды на взаимодействие с тимусной ДНК 14
- Веселков Д.А., Евстигнеев М.П., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н.** Статистико-термодинамическая модель гетероассоциации ароматических молекул в водном растворе на основе данных ^1H -ЯМР спектроскопии 19
- Шестопалова А.В., Анищенко Д.Б., Малеев В.Я.** Изучение гидратации различных структурных форм полирибозитидиловой кислоты и ее компонентов методом Монте Карло. 3. Роль воды в стабилизации спиральных форм полирибозитидиловой кислоты 26
- Степаньян С.Г., Дурнева О.В.** Квантовомеханическое исследование структуры пролинсодержащего циклодекапептида антаманида 33
- Grigoriev D., Zhuchkova G., Andrushchenko V., Kornilova S.V., Blagoi Yu.P.** Study of Cu^{2+} ions effect on poly(I) conformation in solution by viscometry and IR spectroscopy methods 39
- Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S.** Mass-spectrometric study of liquid solution of amino acid proline in ethanol at temperatures below 0°C 44
- Краснокутский С.А., Иванов А.Ю., Шеина Г.Г., Благой Ю.П.** Конформационная изомерия молекул рибозы и 2-дезоксирибозы изолированных в низкотемпературных инертных матрицах 49
- Жигалова Н.М., Зозуля В.М., Рязанова О.О.** Взаємодія карміноміцину з полі (А) та полі (У) за даними поляризованої флюоресценції 56
- Дуплий Д.Р., Дуплий С.А.** Анализ симметрий генетического кода и степень детерминации кодонов 60

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ • CELL BIOPHYSICS

- Korsovskaya O.V., Terenetskaya L.P., Lisetski L.N.** On a possibility to monitor the vitamin D formation processes using selective reflection properties of cholesteric liquid crystals 71
- Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є., Алексєєв О.О.** Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності

розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за
індексом сферичності 75

Манько В.В., Король Т.В., Клевець М.Ю., Демків О.Т. Дослідження Ca^{2+} -
транспортних систем секреторних клітин екзокринних залоз з
використанням хлортетрацикліну 79

Пронь І.О., Тизьо Р.В., Санагурський Д.І. Роль глутаматних та ГАМК
рецепторів у регуляції електричної активності епітеліально-м'язових
клітин *Hydra oligactis* Pallas 82

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEM

Кононов О.В., Кононов М.В., Новоселець М.К., Палій І.М. Числове
моделювання лазерної термотерапії пухлин головного мозку 85

Барабаш Ю.М., Березецкая Н.М., Капустина М.Т., Харкянен В.Н.
Исследование медленной кинетики фотовозбуждения и релаксации
реакционных центров фотосинтетических бактерий 96

Новоселець М.К., Радченко С.П. Статистичне моделювання кореляційних
залежностей текстурних параметрів ультразвукових зображень
паренхіматозних органів 103

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

Горобченко О.А., Николов О.Т., Берест В.П., Гаташ С.В. Зависимость
гидратации фибриногена от дозы γ -облучения по данным СВЧ-
диэлектрметрии 108

Мороз В.А. Мас-спектрографія зони місцевого променевого ушкодження
шкіри 112

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS

Горбунов Л.В., Морозова И.А., Герасименко Л.Н. Определение
оптимального соотношения скоростей оттаивания к замораживанию,
позволяющего реализовать высокую сохранность
девитрифицированных эмбрионов млекопитающих 116

РЕФЕРАТИ (Англ.) ♦ ABSTRACTS (in English) 119

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.2:577.323.425:577.323.427

A THEORETICAL STUDY OF THE DOUBLE-PROTON
PHOTOTAUTOMERISM IN 7-AZAINDOLE DIMERV.I. Danilov¹, O.N. Slyusarchuk¹, J.J. Stewart², J.L. Alderfer³¹*Department of Quantum Biophysics, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
Zabolotny Str. 150, Kiev-143, 252143, Ukraine,*²*Stewart Computational Chemistry, 15210 Paddington Circle, Colorado Springs, CO 80921-2512, USA*³*Biophysics Department, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY 14263, USA*

A detailed study of the potential energy curves for the double-proton transfer along hydrogen bonds (H-bonds) in the 7-azaindole (7AI) dimer in the ground (S_0) and lowest singlet excited (S_1) states are presented. Calculations were carried out by the semi-empirical AM1 method including configuration interaction. It is shown that in the S_1 state the rare tautomeric form of the dimer is more stable than its normal form and it can become responsible for the spectrum of long-wave fluorescence. Calculations of the 7AI dimer with full geometry optimization in comparison to ones where the H...N7 distance in the N1-H...N7 bonds was not optimized provides more realistic parameter values characterizing the potential curves of H-bonds. The simplest model system representing 7AI dimer normal and rare forms, which allows to perform calculations for both forms of the dimer in the S_0 and S_1 states with full geometry optimization is suggested. It is found that the minimum corresponding to the rare tautomeric form of the dimer is deeper than the normal form. This result supports main conclusion made from the potential curves. Comparison of the calculated maxima of the absorption and fluorescence bands for the rare dimer form shows a large Stokes shift of green emission which is close to the one observed in experiments.

Key words: 7-azaindole, hydrogen bond, potential curves, proton transfer, phototautomerism, fluorescence.

INTRODUCTION

Double-proton phototautomerism was first detected [1] when studying the fluorescence spectrum of 7AI in 3-methylpentane at room temperature as function of concentration. It was shown [1] that along with the normal fluorescence band (violet fluorescence) peculiar to the monomer form ($\lambda_{\text{fluor}} = 325 \text{ nm}$) a new band ($\lambda_{\text{fluor}} = 475 \text{ nm}$) occurs in the radiation spectrum, that becomes more intensive if, by means of increasing concentration of 7AI, the equilibrium is shifted in the direction of forming a self-associating dimer. Analysis of possible mechanisms consistent with the occurrence of the long-wave band of fluorescence (green fluorescence), enabled the authors to conclude [1] that a rare tautomeric form of the 7AI dimer is responsible for the observed green band of fluorescence. That rare form is produced as a result of simultaneous intermolecular transfer of two indolic protons (Fig.1) in an excited-state of the normal dimer form.

A necessary condition to produce such a transfer is that potential energy curves for mutual movement of protons of H-bonds in the S_0 and the S_1 states must have two minima each asymmetrically opposed to each other [1]. If this is the case, in the S_0 state, the deeper minimum corresponds to the normal tautomeric form of H-bonded dimer, and in the S_1 state, to its rare tautomeric form. Then the maximum of absorption of the 7AI dimer would be close to that of the normal form of the 7AI monomer, the phenomenon observed in experiment [1]. At the same time light emission from the 7AI dimer corresponds to fluorescence of the rare tautomer of the 7AI dimer. With this, maximum fluorescence of the 7AI dimer experiences a significant red shift as compared to the maximum fluorescence of the normal form of the 7AI dimer. This phenomenon may explain the observed green band in the 7AI dimer fluorescence spectrum.

The first theoretical study of the potential energy curves for the mutual movement of protons along H-bonds of the 7AI dimer in the S_0 and S_1 states have been performed by us [2]. The form of the potential curves which we obtained confirmed the presence of the necessary condition for the dimer fluorescence in the rare tautomeric form, as postulated earlier [1] using a similar interpretation of the experimental results. The presence of considerable Stokes' shift in the 7AI dimer fluorescence spectrum was also confirmed. Fluorescence study on N-methyl-derivatives of 7AI at various concentrations [3] also supports the presence of the double-proton phototautomerism in H-bonded 7AI dimers.

Further experimental proof of the double-proton phototransfer was given [4] where the authors concluded that a potential with two minima along the coordinate of simultaneous movement of the two H-bonded protons exists in the S_1 state of the dimer. The photophysics of 7-azaindole was studied by a number of other researchers in nonpolar solvents at 77K and at room temperature [5-9]. In particular, the conclusion was made [7] that the observed increase of tautomeric emission most likely does not differ significantly from the rate constant for proton transfer.

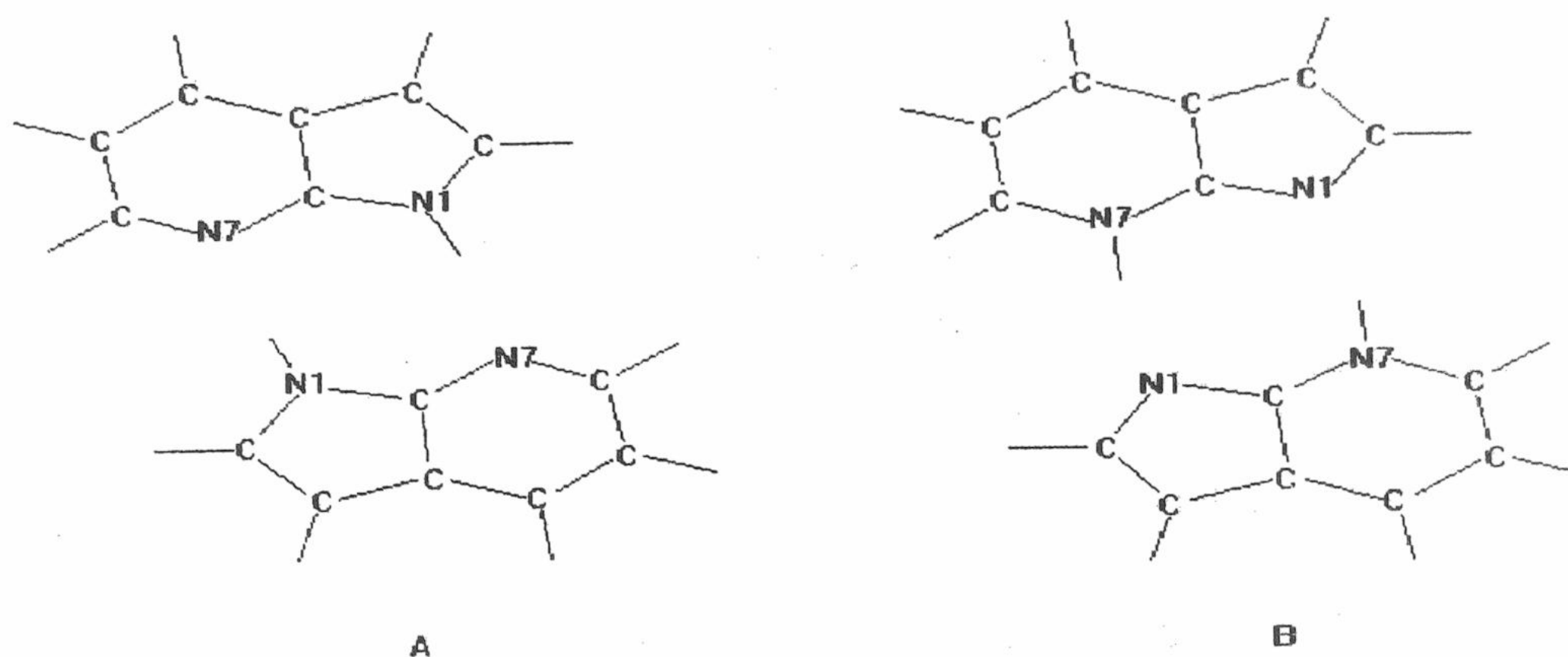


Fig. 1. Schematic picture of normal (A) and rare (B) tautomeric forms of the 7-azaindole dimer.

Along with the above-mentioned facts, it was shown [4] that two fluorescence bands of 7AI are observed not only in nonpolar solvents, but in ethanol and other alcohols as well. In other words in the S_1 state the double-proton transfer takes place not only in 7AI dimers, but also in 7AI - alcohol complexes. In connection with the experimental work [4] we calculated the potential energy curves for the mutual movement of protons along H-bonds of the 7AI - ethanol complex in the S_0 and S_1 states [10]. The obtained form of the potential curves confirmed the possibility of proton transfer to the S_1 state of the complex.

Several groups of researchers have investigated the tautomerization of 7AI in a variety of alcohol solvents [10-14]. The emission of 7AI has been studied in water too [12, 14-17]. It should be noted that in the opinion of the authors [11,18] the potential curve in the excited-state must have a minimum corresponding to the rare tautomeric form of 7AI dimer in hydrogen-bonded dimers and solute/solvent complexes. Therefore the existing experimental data is consistent with the occurrence of double-proton phototautomerism both in 7AI dimer and 7AI - solvent complexes.

In 1979 another attempt was undertaken to study theoretically the potential energy curves concerning transfer of protons in the 7AI dimer [19]. In this study, the potential energy curves corresponding to the double-proton transfer in the 7AI dimer's S_0 and S_1 states were calculated by the CNDO/2 method. While the movement of the two protons occurred, the monomers' geometry and the H-bond's length was kept constant (3.0 Å). In other words, for calculation of the H-bonds' potential curves in case of simultaneous transfer of protons, a fixed geometry for the framework of heavy nuclei (a hard framework model) was used [19]. This suggested that movement of protons along the H-bonds is in no way correlated with the deformation of the heavy nuclei's framework. Results of these calculations [19] showed that in the dimer's S_0 state the potential curve is high asymmetric: its deeper minimum corresponds to normal dimer's form and its shallower minimum – to the rare tautomeric form. In the S_1 state, the asymmetry of the potential curve decreases considerably and the curve becomes almost symmetric. However the value of the barrier's height for this curve remains very high (near 5 eV). In this connection the authors [19] carried out similar calculations for other fixed lengths of H-bonds (2.8 and 2.6 Å). In these cases, the barrier's height considerably decreased reaching a minimum at 2.6 Å, however the general picture found for the H-bond length of 3 Å remained unchanged. Although it was shown that the barrier's height depends very much on length of H-bonds in dimer, the problem of their real length remains unanswered.

Furthermore, in all the cases considered by Catalan and Perez [19], the rare tautomeric form of dimer remains less stable than the normal one. Meanwhile, it follows from the experimental data [4,5] that in the S_1 state rate constant for the proton transfer from pyrrolic rings to pyridine ones is much higher than the rate constant of reverse reaction. This reflects the fact [4] that the minimum on the potential curve for proton transfer in the 7AI dimer, which corresponds to rare tautomeric form of dimer, is much deeper than the minimum corresponding to its normal form.

It should be noted that the electron absorption energy of the normal and rare tautomeric forms of the 7AI dimer which was calculated based on the potential energy curves [19] is several eV higher than the experimentally obtained one [1,8,11,12]. It is caused by the fact that the CNDO/2 method used in Ref. [19] does not satisfactorily describe the spectral characteristics.

Some information for the shape of the potential energy surface in the S_0 and S_1 states is also provided by the experimental and theoretical studies [20-22]. It was calculated that in the S_1 state of a 7AI dimer tautomerization 7AI is exergonic, i.e. energetically favorable.

In order to elucidate the shape of the potential energy surfaces the HF and MP2 ab initio calculations of the normal and rare tautomeric forms of the 7AI dimer as well as the transition state in the S_0 and S_1 states are quite recently performed [23] using the 3-21G and 6-31G(d) basis sets. It is detected that in S_1 state the rare tautomer is more stable than normal tautomer although the difference of energy between tautomers is very small. The barrier for

A theoretical study of the double-proton phototautomerism ...

the proton transfer notably decreases in relation to the S_0 state however it is still too big to allow the proton transfer reaction across this transition state. However, the small difference of energy between tautomers leads to potential energy curves with an almost symmetric profile and so the proton transfer could happen by tunneling, according to experimental and theoretical results [24,25]. At the same time the obtained values for the absorption and the emission notably differ from the experimental ones.

All this serves a foundation for further theoretical study of 7AI dimer electronic properties. In this paper the results of the detailed study of potential energy curves for the double-proton transfer along H-bonds in the 7AI dimer (see Fig.1) in the ground and the first singlet excited states without using a hard framework model are presented.

MATERIALS AND METHODS

At the present moment, the calculations for the S_0 state can be carried out by ab initio method. At the same time the complexity of the molecular systems considered makes the ab initio calculations for the excited state extremely labor-intensive. In addition, ab initio methods is not able to predict the correct excitation energies (see [23]). Therefore, the calculations were carried out by the semiempirical AM1 method with geometry optimization.

The energy values of the 7AI dimer in the S_0 state were calculated for different positions of protons in H-bonds. This procedure allowed to obtain a potential curve. In order to compare the obtained results with the previous investigations [2,19], originally, the H...N7 distance was not optimized in the calculation. This distance was chosen for each position of the protons so that the condition $R(N1-H) + R(H...N7) = 3 \text{ \AA}$ was satisfied (optimized geometry case). Besides, we carried out the same calculations of potential curves where during geometry optimization this condition was removed (fully optimized geometry case). In doing so the fact that movement of H-bonded protons is tightly connected with deformational movement of the heavy atom nuclear framework is taken into consideration. Using this method of optimization, H-bonds may be both linear and non-linear. At last for calculation of the H-bond potential curve in the S_1 state, the same geometry was applied as used for the S_0 state. Thus, in this case the potential energy curve in the S_1 state is the Frank-Condon potential curve. To calculate potential curves the N1-H bond length remained the only fixed parameter.

When building a multi-configurational wavefunction of the S_0 and S_1 states, all the active space of SCF MO were used consisting of the four HOMO and two LUMO MO obtained for the SCF configuration of the ground-state. In this case the dimer wavefunction consists of the ground-state configuration and all the singly-, doubly-, triply-, and quadruply-excited configurations involving the active space (225 microstates in MOPAC representation). The obtained results are reported below. It should also be noted, the calculations were also carried out using two other multi-configurational wavefunctions built on two HOMO - two LUMO and two HOMO - four LUMO SCF MO of the ground state. However, the use of these wavefunction produces worse results.

RESULTS AND DISCUSSION

The calculated potential energy curves for protons for the optimized geometry case are given in Fig. 2. As can be seen from this figure, the curve for the S_0 state is highly asymmetric with a deeper left well which corresponds to the normal tautomeric form of the dimer with an equilibrium disposition of protons near the nitrogen atoms of the pyrrolic rings. In the S_1 state of the dimer which, as follows from our analysis of its wavefunction, represents a π, π^* state for each position of the protons, the right well is deeper. So, in the lowest excited state, the most stable position of the protons is localized near the pyridinic rings. In other words, in the S_1 state, the rare tautomer is a more stable form of the dimer. Hence, there is the necessary condition that the fluorescence of the dimer is determined by its rare tautomeric form.

Energetical characteristics of hydrogen-bonds potential curves for 7-azaindole dimer calculated for the S_0 and S_1 states are given in Tab. 1.

Table1. Energetical characteristics of hydrogen-bonds potential curves for 7-azaindole dimer in the ground (S_0) and first singlet excited (S_1) states (in eV)

Potential Curve	S_0			S_1		
	Optimized Geometry	Fixed geometry	Fully optimized geometry	Optimized geometry	Fixed geometry	Fully optimized Geometry
Left minimum	-0.114	-0.114	-0.165	4.214	4.214	4.224
Maximum	2.803	2.983	1.427	6.525	6.679	5.125
Right minimum	0.932	1.504	0.926	4.033	4.406	4.030

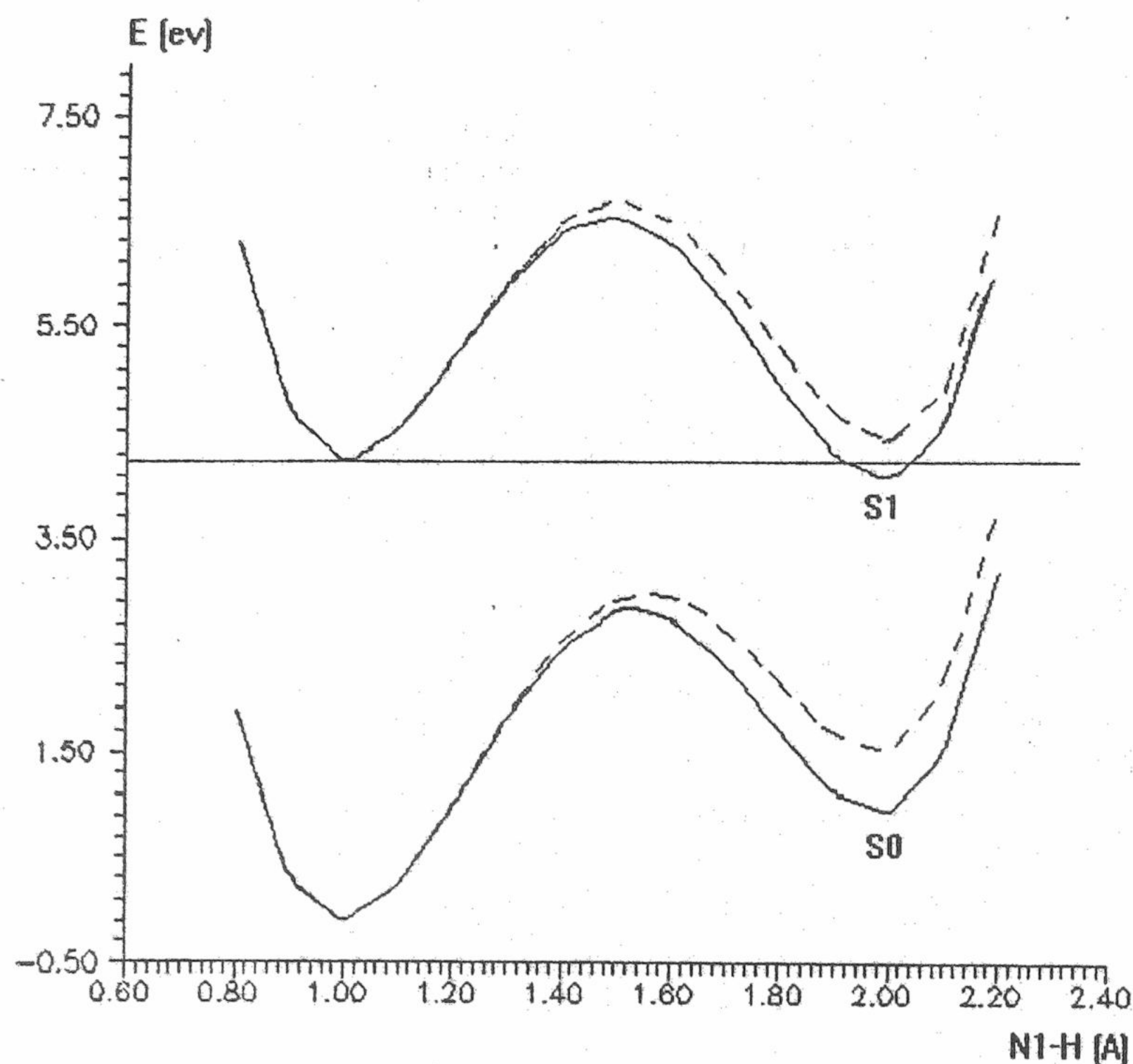


Fig. 2. Potential energy curves for the 7-azaindole dimer with simultaneous movement of hydrogen bonds protons in the ground (S_0) and the first singlet excited states (S_1).

They allow to calculate electron transition energies. The obtained transition energies also support the mechanism of the double-proton tautomerism. Based on difference of energy at the minimum point of the left wells of the potential curves in the S_1 and S_0 states (see Table 1 and Fig. 2), it is possible to determine that the excitation energy of the normal form of the dimer is equal to 4.33 eV. This value is very close to the experimental value (4.29 eV) based on the absorption maximum of the 7AI dimer [11]. The excitation energy of the rare tautomeric form of dimer calculated at the minima of the right wells is equal to 3.10 eV. Comparison of this value with experimental ones [8,9,11,26] for the rare dimer form (3.31 eV) and tautomeric form of the monomer (3.17-3.22 eV) indicates good agreement between theory and experiment.

Potential curves for the S_0 and S_1 states calculated with fixed geometry of the framework of heavy nuclei (indicated as a large dashed lines) are also depicted in Fig. 2. In this case for each position of the protons H-bonds in the 7-AI dimer, its geometry remained the same as the equilibrium geometry of the normal form found during optimization of the ground state of the dimer.

It can be seen that in the S_1 state the normal form of dimer is the more stable form unlike that was in optimized geometry case where the rare form was stable. At the same time the other properties of the potential curves remain in general the same as were obtained during optimization. This confirms our suggestion that was presented above regarding why the earlier study [19] was not able to obtain the correct asymmetry of the potential curves in the S_1 state. Thus, both the potential curves and transition energies which we calculated confirm our previous conclusion [2] that in the S_1 state, the rare tautomeric form of the 7AI dimer is more stable than its normal form and, under certain conditions, it can become responsible for the spectrum of long-wave (green) fluorescence.

It should be noted (see Fig. 2) that the resultant height of the potential barrier for two protons moving simultaneously in opposite directions is rather considerable (2.92 eV). It is obvious that it is first of all caused by the fact that during optimization of the dimer, we imposed the condition of $R(N1-H) + R(H...N7) = 3 \text{ \AA}$ (a condition clearly justified by our results) which does not almost change the H-bond lengths. In this calculation a small decrease in $N1...N7$ distance for various positions of protons that we can observe is due to bending of the H-bonds.

Previous studies have shown [27,28] the relationship between the movement of protons and the deformational movement of the framework of the dimer's heavy nuclei which mostly influences the distance between monomers. Therefore we carried out the same calculations of potential curves where during geometry optimization the condition of $R(N1-H) + R(H...N7) = 3 \text{ \AA}$ was removed. The resultant potential curve calculations for fully optimized geometry are shown in Fig. 3.

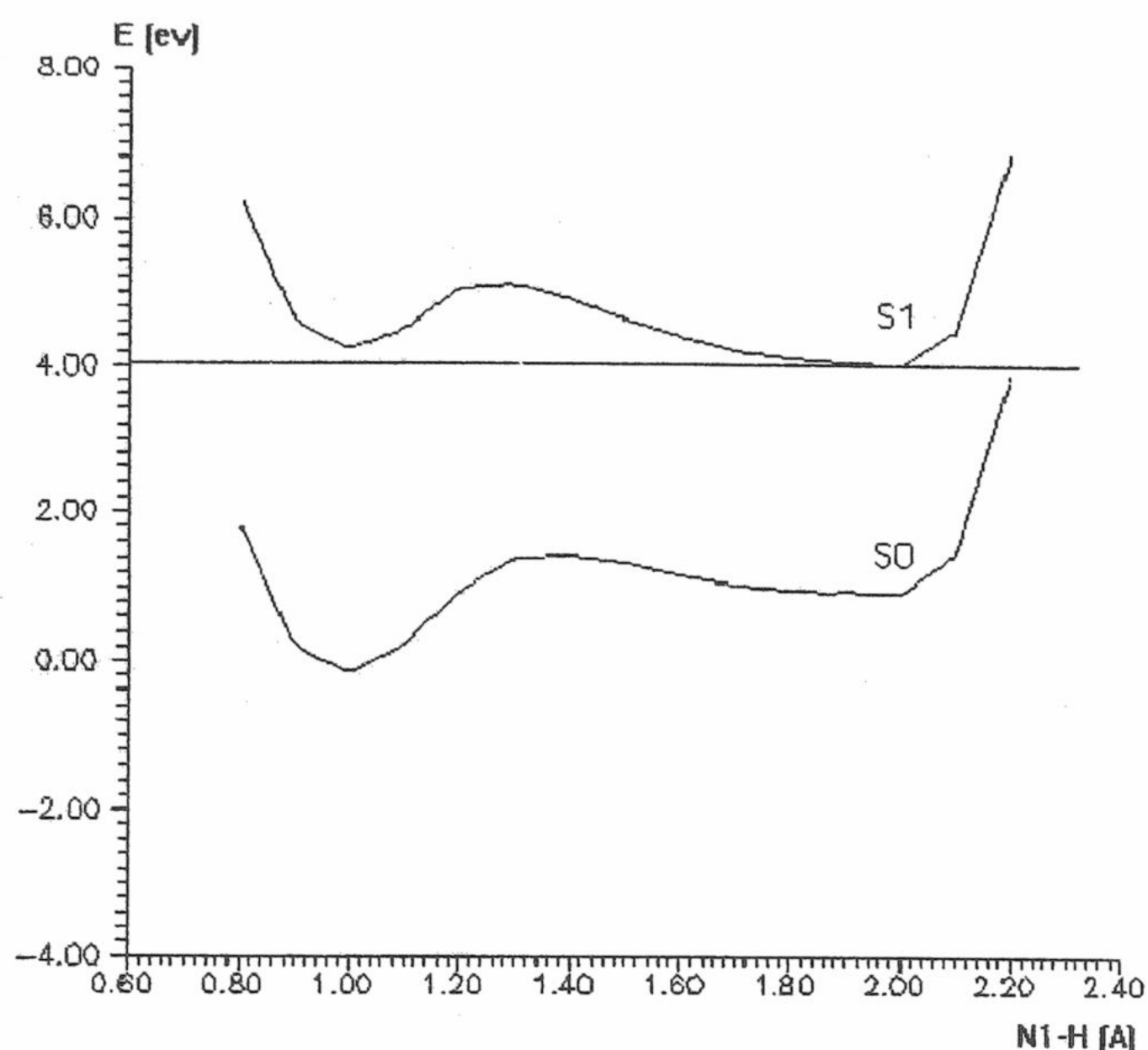


Fig. 3. Potential curves for transfer of two protons along hydrogen bonds of 7-azaindole dimer in the ground (S_0) and first singlet excited state (S_1) for the bounded movement of protons and the framework of heavy nuclei.

As it can be seen, the character of the potential curves given in Figs 3 and 2 is qualitatively similar. Like in the previous case, the rare tautomeric form of the dimer remains the more stable form in the S_1 state.

The analysis of the obtained atom charges for fully optimized geometry case allows to get some additional information on the reason of H-bonds potential curves change in 7AI dimer. The charges on proton-donor and proton-acceptor atoms are of special interest since they for the most part determine the shape of potential curves.

When we move from the S_0 to the S_1 state for 7AI dimer's normal form the negative charge on N1 proton-donor atoms does not change much ($-0.19 \rightarrow -0.23$ |e|). At the same time the negative charge on N7 proton-acceptor atoms significantly increases ($-0.17 \rightarrow -0.37$ |e|). This is favorable for protons transfer to these atoms. As we move from the S_0 to the S_1 state for 7AI dimer's rare form the negative charge on N7 proton-donor atoms noticeably increase ($-0.08 \rightarrow -0.20$ |e|) whereas the negative charge on N1 proton-acceptor atoms substantially decreases ($-0.29 \rightarrow -0.06$ |e|). This promotes the change of H-bonds potential curve symmetry in the S state and, hence, protons transfer.

Comparison of Figs. 2, 3 and Table 1 data shows that the height of the potential barrier decreases considerably and it is 1.59 and 0.90 eV for the S_0 and S_1 states, respectively. If the protons in the H-bonds move from the pyrrolic rings to the pyridinic ones, the H-bond lengths decrease considerably (from 3.52 to 2.58 Å) in the interval $R(N1-H) = 1.0 - 1.4$ Å, and their length increases considerably (from 2.61 to 3.30 Å) in the interval 1.5 - 2.3 Å. This observation demonstrates the close correlation between the movement of protons and the optimized distance, $R(H...N7)$.

Energy values of the first electron transition for the normal and rare tautomers, which can also be obtained using Table 1 remain unchanged and agree with the experimental results. Hence, we again conclude a higher stability of the rare tautomer compared with the normal one in the S_1 state.

Energy values for the extreme points of the curve (both minima and the maximum) in the S_1 state for three different H-bond lengths (3.0, 2.8, and 2.6 Å) were calculated by us. They show that if the H-bond length decreases, the barrier height decreases considerably. A similar conclusion was made earlier [19] however there the left well happened to be deeper than the right one. This can be explained by the fact that authors of the work [19] did not optimize the geometry of the dimer. It should be noted that analysis of the data obtained following optimization shows that the principal contribution to an increase of the right well depth is made by forming non-linear H-bonds (a bending of $7-12.5^\circ$, depending on H-bond length). Thus, calculations with an optimally deformed framework of heavy atoms (fully geometry optimization case) of the 7AI dimer in the S_0 state provides more realistic parameter values characterizing the potential curves of the H-bonds in the S_1 state.

It should be emphasized that according to the experiment a large energy barrier is not expected. So, in according to the most precise experimental data [29,30] for the 7AI dimer an energy barrier of a few kcal/mol for the ground state reverse proton transfer has been reported. Meanwhile, neither one of the above considered cases brings the correct value of the potential barrier height for the S_0 and S_1 states. This is not amazing, since in the semiempirical methods (in

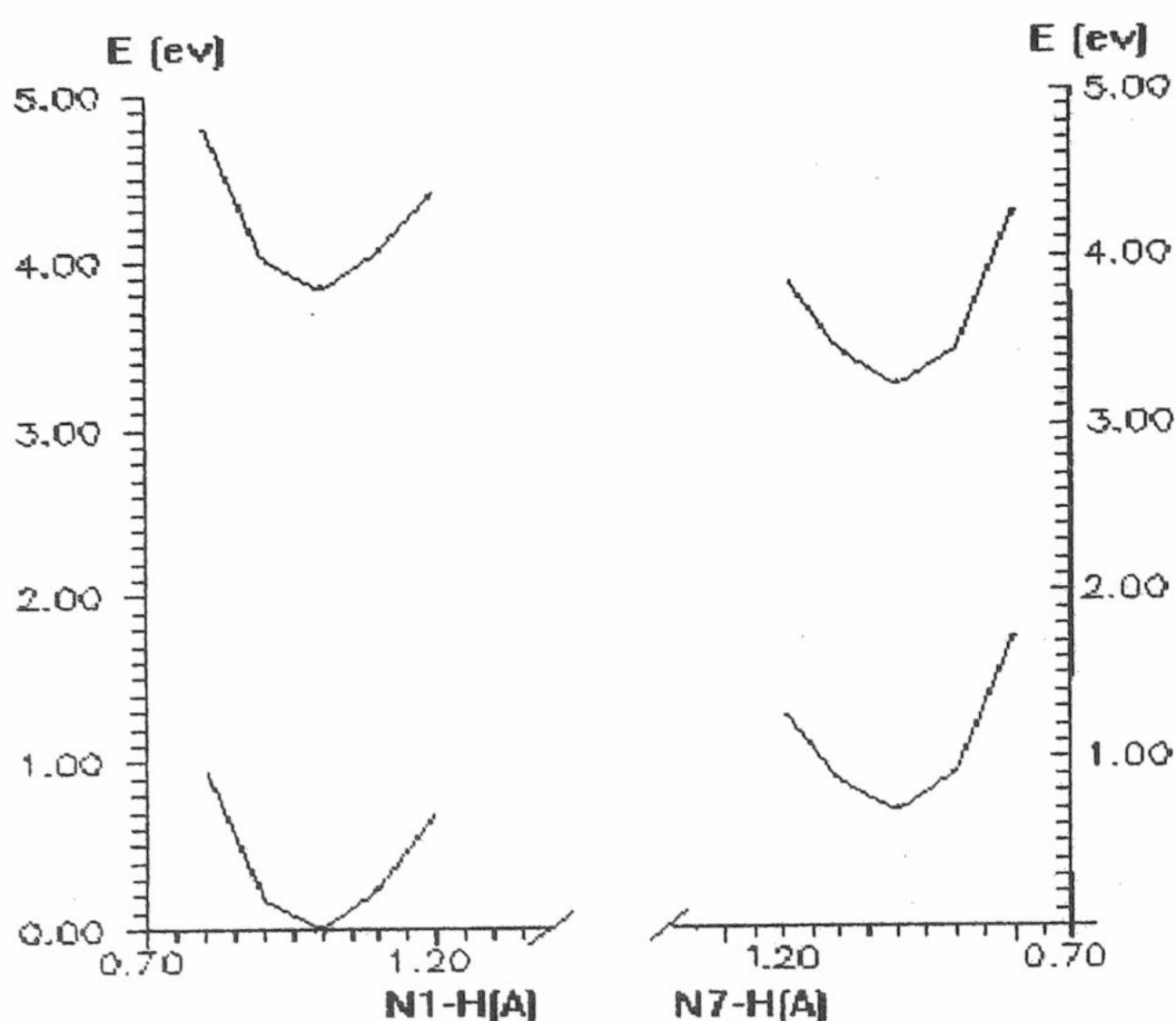


Fig. 4. Potential energy of the normal and rare tautomeric forms of 7-azaindole as a function of the N1-H and N7-H bond lengths in the vicinity of the equilibrium position, respectively.

particular, AM1 method) all terms arising from the overlap of two atomic orbitals which are on different centers or atoms are set to zero. The semiempirical methods reproduce various properties only near equilibrium points.

To obtain more reliable values of the characteristics of the potential curves in the S_1 state, it is necessary to perform calculations of the energies of 7AI dimer's excited-state for various positions of the protons in the H-bonds with full geometry optimization. In this case, it would be possible to compare directly the theoretical data with available experimental data on fluorescence of the normal and rare tautomeric forms of the 7AI dimer, as well as provide a quantitative explanation of the position of maximum of the green fluorescence band in the 7AI dimer.

When calculating the first excited state for a symmetry-related pair of molecules, it is reasonable to expect the excited-state to be 50% on each member of the pair. Indeed, after initial photoexcitation, the excitation energy is calculated to be 50% in each of the molecules. This fact is due to the symmetry of the system, which demands the two monomers be equivalent. However as soon as the geometry is allowed to relax the excited-state is stabilized in one molecule, and the other molecule stays in its ground-state geometry. In other words, if the geometry is optimized, then the excitation energy would be concentrated in one or other of the molecules. This is almost like the Jahn-Teller effect. If the two molecules interact very strongly, then the excited-state might be spread across both molecules.

Actually all our attempts to optimize the geometry of dimer in the S_1 state for various positions of the proton in the H-bonds were unsuccessful, even though all optimization procedures available in the MOPAC 93 package were utilized. In all the cases studied, convergence was absent or excitation was localized on one component of the dimer. The result observed by us, that is, in the first excited state one molecule receives almost 100% of the excitation energy, and the other molecule receives almost nothing, is quite real.

Taking into account the mentioned above, we decided to consider 7AI dimer where interaction between the monomers is absent (i.e. when the distance between them is infinity). Such a dimer is the simplest model system representing a real 7AI dimer. At the same time such a dimer allows to perform calculations for its normal and rare forms in the S_0 and S_1 states with full geometry optimization. Hence, it is easy to obtain a very good quantitative evaluation of the locations of the fluorescence band maximum for both forms of the 7AI dimer.

For this purpose we carried out the calculations for normal and rare forms of 7AI in the S_0 and S_1 states with full geometry optimization for several positions of the proton in the vicinity of the equilibrium position. The obtained results produce the potential curves of the H-bonds near their minima for a 7AI dimer.

When calculating the wavefunction for the S_0 state, a single-configuration approximation was applied. For the wavefunction of the S_1 state we used the configuration interaction method in which all the singly-excited configurations built on two HOMO and two LUMO MO of corresponding forms of 7AI were taken into consideration.

The potential energy of each form of 7AI, as a function of the N1-H bond length in the vicinity of the equilibrium position, is presented in Figure 4.

Comparison of the calculated maxima of the absorption and fluorescence bands for the rare dimer form (see Figs 2 and 4) shows a large Stokes' shift of green emission (87 nm) which is close to the one observed in experiments (100 - 110nm) [1,2,4,6,7,9,26,31].

The carried out calculations for the same simplest model system for the S_0 and S_1 states with a more sophisticated wavefunction (it consists of the four HOMO and two LUMO MO obtained for the SCF configuration of the ground-state) yielded similar results.

The double-proton phototautomerism was proposed [1,4] as a mechanism of inducing mutations in DNA by UV-light. The corresponding potential curves for DNA base pairs calculated by us [32,33] did not confirm this conclusion. A similar result was reported by Blizzard and Santry [34] and Chojnacki et al.[28] which were obtained by CNDO/2 and INDO/L methods, respectively. Recently the formation of rare tautomeric forms of the Watson-Crick base pairs in the ground and low-energy excited singlet electronic states was considered [35] by ab initio HF method. It was shown that in the excited singlet states with excitation localized on the one of the bases of the pair the double proton transfer becomes energetically more accessible as compared with S_0 state. However, in the opinion of the authors [35] it is unlikely that the rare tautomer may live long enough to perturb the duplication of the genetic information. At the same time in this work is discussed the possibility that the charge-transfer excited electronic states may play a key role in mutagenesis. It is obvious that this problem requires further investigation.

REFERENCES

1. Taylor C.A., El-Bayoumi M.A., Kasha M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1969. V.63. P.253-260
2. Pechenaya V.I., Danilov V.I. // Chem. Phys. Lett. 1971. V.11. P.539-541
3. Ingham K.C., Abu-Elgheit M., El-Bayoumi M.A. // J. Am. Chem. Soc. 1971. V.93. P.5023-5025
4. Ingham K.C., El-Bayoumi M.A. // J. Am. Chem. Soc. 1974. V.96. P.1674-1682
5. El-Bayoumi M.A., Avouris P., Ware W.R. // (1975) J. Chem. Phys. 1975. V.62. P.2499-2500
6. El-Bayoumi M.A. // (1976) J. Phys. Chem. 1976. V.80. P.2259-2264
7. Hetherington III W.M., Micheels R.H., Eisenthal K.B. // Chem. Phys. Lett. 1979. V.66. P.230-233
8. Share P., Pereira M., Sarisky M., Repinec S., Hochstrasser R.M. // J. Lumin. 1991. V.48/49. P.204-208
9. Chou P.-T., Wei C.-Y., Wu G.-R., Chen W.-S. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V.121. P.12186-12187
10. Danilov V.I., Il'chenko L.G., Pechenaya V.I. // Proceedings of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR. (in Russian). 1978. P.254-256
11. Bulska H., Grabowska A., Pakula B., Sepiol J., Waluk J., Wild Urs P. // J.Lumin. 1984. V.29. P.65-81
12. Fuke K., Yoshiuchi H., Kaya K. // J. Phys. Chem. 1984. V.88. P.5840-5844
13. Avouris P., Yang L.L., El-Bayoumi M.A. // Photochem. Photobiol. 1976. V.24. P.211-216
14. Konijnenberg J., Huizer A.H., Varma C.A.G.O. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. II. 1988. V.84. P.1163-1175
15. Chen Y., Gai F., Petrich J.W. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V.115. P.10158-10166
16. Chou P.-T., Martinez M.L., Cooper W.C., McMorro D., Collins S.T., Kasha M. // J. Phys. Chem. 1992. V.96. P.5203-5205
17. Chapman C.F., Maroncelli M. // J. Phys. Chem. 1992. V.96. P.8430-8441
18. Chen Y., Rich R.L., Gai F., Petrich J.W. // J. Phys. Chem. 1993. V.97. P.1770-1780
19. Catalan J., Perez P. // J. Theor. Biol. 1979. V.81. P.213-221
20. Chou P.-T., Wei C.-Y., Chang C.-P., Chiu C.-H. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V.117. P.7259-7260
21. Chou P.-T., Wei C.-Y., Chang C.-P., Kuo K.M.-S. // J. Phys. Chem. 1995. V.99. P.11994-12000
22. Danilov V.I., Mikhaleva O.V., Slyusarchuk O.N., J.J. Stewart, J.L. Alderfer // Biopolymers and Cell (in Russian). 1997. V.13. P.261-268
23. Grana A.M. // J. Mol. Struct. 1999. V.466. P.145-153
24. Douhal A., Kim S.K., Zewail A.H. // Nature. 1996. V.378. P.260
25. Douhal A., Guallar V., Moreno M., Lluch J.M. // Chem. Phys. Lett. 1996. V.256. P.370
26. Robison M. M., Robison B.L. // J. Am. Chem. Soc. 1955. V.77. P.6554-6559
27. Graf F., Meyer R., Ha T.-K., Ernst R.R. // J. Chem. Phys. 1981. V.75. P.2914-2918
28. Chojnacki H., Lipinski J., Sokalski W.A. // Int. J. Quantum Chem. 1981. V.19. P.339-346
29. Tokumura K., Watanabe Y., Itoh M. // J. Phys. Chem. 1986. V.90. P.2362-2366
30. Tokumura K., Watanabe Y., Udagava M., Itoh M. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V.109. P.1346-1350
31. Bulska H., Chodkowska A. // J. Am. Chem. Soc. 1980. V.102. P.3259-3261
32. Pechenaya V.I., Danilov V.I. // Biofizika (in Russian). 1973. V.18. P.560-561
33. Danilov V.I., Zheltovsky N.V., Pechenaya V.I. // Int. J. Quantum Chem. 1980. V.17. P.307-320
34. Blizzard A.C., Santry D.P. // J.Theoret. Biol. 1969. V.25. P.461-472
35. Guallar V., Douhal A., Moreno M., Lluch J.M. // J. Phys. Chem. 1999. V.103. P.6251-6256

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ПРОИЗВОДНЫХ АКТИНОЦИНА С ДНК.

1. ВЛИЯНИЕ ВОДЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ТИМУСНОЙ ДНК.

М.А. Семенов, А.И. Гасан, В.Я. Малеев, Т.В. Больбух, Н.Н. Сагайдакова,
Е.Б. Круглова, А.Н. Веселков*, Е.Н. Глибин**.

Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, Харьков-85, 61085, ул. Акад. Проскуры, 12,

E-mail: maleev@ire.kharkov.ua

*) Севастопольский государственный технический университет

**) Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

Статья поступила в редакцию 14 июня 2000 г.

Методами ИК-, УФ- и видимой спектроскопии, а также пьезограмметрии изучены особенности образования комплексов краун-актиноцина с тимусной ДНК во влажных пленках и растворах. Показано, что наиболее вероятным механизмом связывания красителя с ДНК является интеркаляция феноксазиновых колец актиноцина в стопку азотистых оснований и образование стабильной гидратной структуры комплекса за счет взаимодействия молекул воды с полярными группами красителя и гидратно-активными центрами ДНК. Краун-эфирные группы красителя, взаимодействуя с противоionsами ДНК, связываются с молекулами воды и фосфатами, что не позволяет дезоксирибозе при высоких активностях воды принять $C2'$ - эндо-конформацию. Найдено, что термостабильность комплекса ДНК-L выше по сравнению с чистой ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, комплекс, гидратация, спектроскопия, актиноцин.

В связи с несомненными успехами работ по полной расшифровке генетического кода человека, которые выполняются в рамках международной программы "Геном человека", особую актуальность приобрели исследования, направленные на поиск новых веществ, способных оказывать влияние на биологическую активность нуклеиновых кислот, в первую очередь, ДНК. Недавно в Санкт-Петербургском государственном техническом университете были синтезированы такие новые соединения - производные актиноцина, являющегося аналогом известного противоопухолевого антибиотика - актиномицина D. В этих соединениях в 1-м и 9-м положениях хромофора (актиноцина) содержатся диметиламинная и краун-эфирная группировки, присоединенные к основному веществу посредством метиленовых цепочек разной длины (Рис. 1).

Известно, что при образовании комплекса ДНК с антибиотиком актиномицином D основным способом связывания лиганда с ДНК является интеркаляция, которая осуществляется путем встраивания системы феноксазиновых колец в GrC- участки ДНК [1,2]. Предварительные исследования особенностей комплексообразования с ДНК краунсодержащих производных актиноцина, выполненные методами

электронной и КД-спектроскопии, вискозиметрии и двойного лучепреломления, показали, что в этом случае связывание актиноцинового хромофора с ДНК осуществляется как путем интеркаляции окрашенного лиганда, так и путем внешнего связывания, при этом способ связывания зависит от количества лиганда в комплексе и от расстояния хромофор - катионный центр боковой цепи. С увеличением этого расстояния уменьшается способность хромофора интеркалировать в двойную спираль ДНК и увеличивается доля внешнего связывания [3].

Настоящей статьей мы начинаем публиковать результаты систематических исследований взаимодействия производных актиноцина с ДНК. Исследования выполняются различными физическими методами с целью получения энергетических и структурных параметров этого взаимодействия и построения молеку-

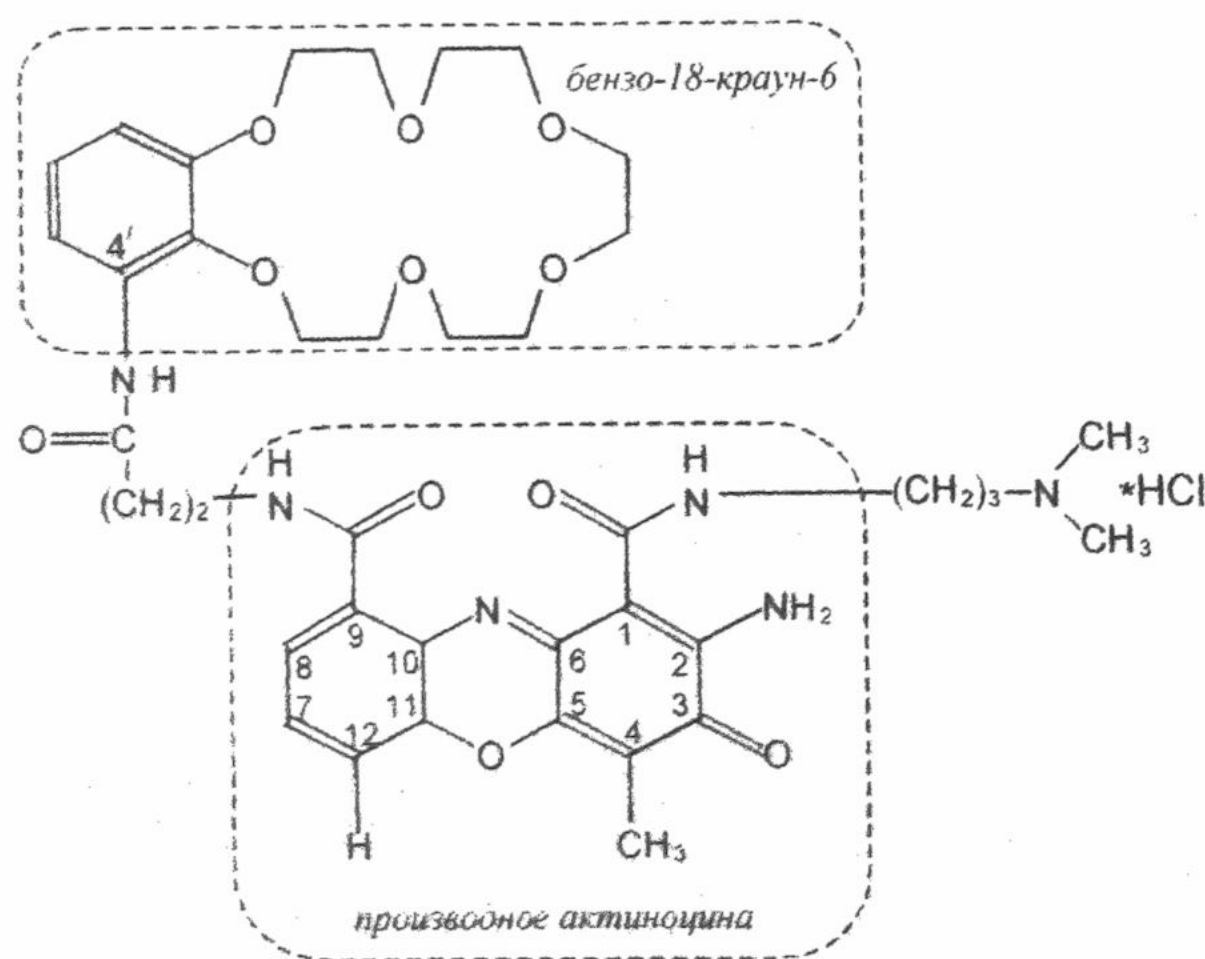


Рис. 1. Структурная формула водорастворимого 1-(3-диметиламинопропил) карбомойл-2-амино-4-метил-9-{2-[(бензо-18-краун-6)-4'-иламинокарбомойл]-этилкарбомойл}-3-Н-3-оксофеноксазина (L).

Физические механизмы взаимодействия производных актиномина с ДНК ...

лярных моделей связывания с учетом влияния водного окружения, нуклеотидного состава ДНК и других факторов комплексообразования.

Главная цель этой работы - выяснение основных особенностей влияния водного окружения на структуру и стабильность комплексов тимусной ДНК с водорастворимым краунсодержащим актиноцином (комплекс ДНК-L). Ранее нами было показано, что основным фактором, стабилизирующим структуру двойной спирали, являются "водные мостики" между соответствующими гидратноактивными центрами ДНК [4]. Естественно предположить, что стабильность комплекса ДНК-L также должна заметным образом зависеть от взаимодействия с водой, так как при образовании таких комплексов происходят существенные изменения в структуре гидратных оболочек молекул, входящих в комплекс. Другими словами, для более полного понимания физических механизмов комплексообразования активного агента с ДНК следует рассматривать не просто комплекс ДНК-L, а систему ДНК-L-вода. Справедливость этого утверждения подтверждается результатами исследования влажных пленок ДНК в комплексе с интеркалирующими красителями [5,6,7] и данными, полученными методом рентгеноструктурного анализа, о наличии пентагонов из молекул воды в структуре кристаллогидратов комплексов интеркалятора-профлавина с динуклеотидфосфатом d(CpG) [8,1].

В настоящей работе объектами исследования являются влажные пленки тимусной ДНК в комплексе с краун-актиноцином L, а также водные растворы этого комплекса. В качестве методов исследования выбраны инфракрасная спектроскопия и спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой области, а также пьезограмметрия. Использование инфракрасной спектроскопии и высокочувствительной пьезограмметрии при исследовании влажных пленок позволило определить центры гидратации комплекса и изменения в структуре ДНК при разных влажностях в процессе образования комплекса. С помощью спектроскопии в видимой и УФ-области были найдены условия образования комплекса ДНК-L в водном растворе и параметры, определяющие термостабильность этого комплекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась тимусная ДНК, выделенная в лаборатории проф. Ландо Д.Ю. (Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск) со следующими характеристиками: нуклеотидный состав $AT/GC = 1,36$, молекулярная масса $M > 10^7$ D, гипохромный эффект $h = 38-39\%$ при $\lambda = 260$ нм, содержание воды - около 10% в пересчете на сухой вес ДНК и ионов - один ион Na^+ на один фосфат. Препарат краунсодержащего актиноцина L с молекулярной массой $M=815$ D был синтезирован в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (техническом университете). Для получения пленок ДНК и комплекса ДНК-L готовились водные растворы ДНК (концентрация 0,3 %) и красителя L (0,2 %). В раствор ДНК добавляли соль NaCl в таком количестве, чтобы содержание этой соли в пленке составляло 3-5% по отношению к сухому весу ДНК. Затем в раствор ДНК малыми объемами добавляли раствор красителя при одновременном тщательном перемешивании и полученную смесь выдерживали в течение 1-2 суток.

Выращивание, увлажнение и дейтерирование пленок ДНК и ДНК-L (с $P/D=4,9$, т.е. отношением молей фосфата ДНК к молям красителя L) осуществляли по специальной методике, разработанной нами ранее для получения инфракрасных спектров пленок в условиях фиксированной влажности образца [9]. ИК-спектры записаны на спектрофотометре UR-20. Спектры растворов ДНК и комплекса ДНК-L в видимой и ультрафиолетовой области записаны на спектрофотометре UV-VIS, Specord M-40 при различных значениях P/D в 0,01M SSC-буфере и при разных концентрациях NaCl. Кривые плавления свободной ДНК и ДНК в комплексе с красителем получены с помощью специальной термостатированной кюветы на спектрофотометре Hitachi, mod.356 при pH 6,0, в 0,1M растворе NaCl, $P/D = 4,0$. Изотермы гидратации (зависимости отношения массы сорбированной воды к массе сухого образца от относительной влажности (ОВ)) ДНК, красителя L и комплекса ДНК-L при $P/D=4,9$ получены с помощью пьезограмметрической установки, описанной ранее [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.2,а,б представлены спектры поглощения красителя в видимой области (360-520 нм) растворов смесей ДНК-L в зависимости от P/D . Видно, что при увеличении P/D интенсивность полосы поглощения уменьшается (гипохромизм до 30%) с одновременным смещением ее максимума в длинноволновую область. Такой характер спектральных изменений от P/D подобен изменениям для ряда катионных красителей [11-13] и свидетельствует об интеркаляции феноксазиновых колец в двойную спираль ДНК. Отсутствие изобестической точки в случае смесей ДНК-L при низких ионных силах (рис.2,а) свидетельствует, по крайней мере, о двух типах связывания красителя L со спиральной структурой ДНК.

Влияние воды на структуру и стабильность комплекса ДНК-L нами изучено в системе ДНК-L-вода с переменным содержанием воды. На рис.3 представлены изотермы гидратации красителя L, «чистой» ДНК (н-ДНК) и их комплекса, а также расчетная изотерма, полученная суммированием изотерм гидратации L и н-ДНК с весами, равными массовым долям L и н-ДНК, соответственно, в исследуемом

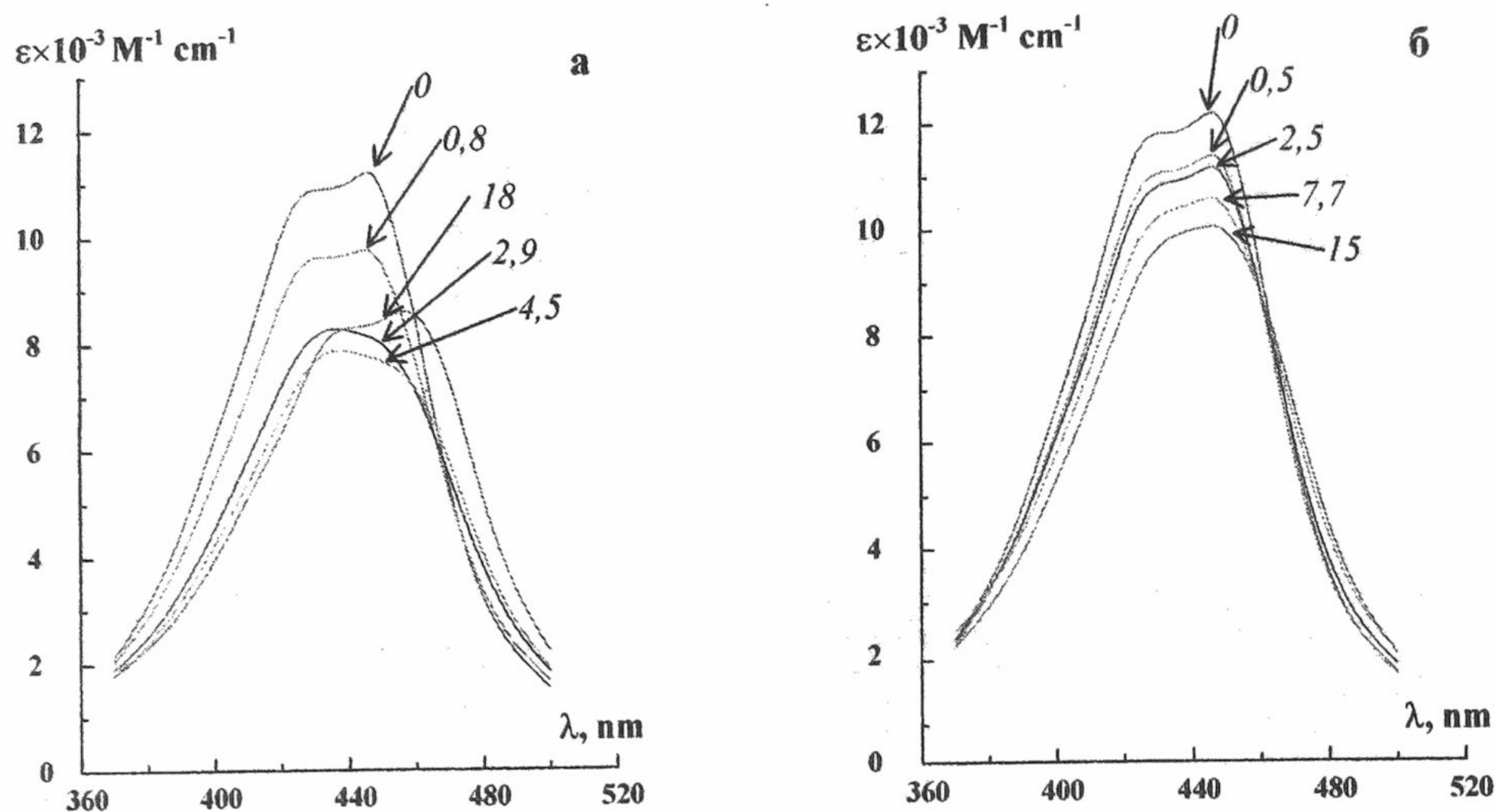


Рис.2. Спектры поглощения смесей ДНК с красителем L при различных значениях R/D (приведены на спектрах): (а) - в 0.01 M SSC-буферном растворе, $C_D = 5,43 \cdot 10^{-5}$ M; (б) - в $1,12 \cdot 10^{-1}$ M NaCl, $C_D = 6,74 \cdot 10^{-5}$ M.

комплексе. Видно, что уровень сорбции воды комплексом выше по сравнению с суммой уровней сорбции воды отдельными компонентами, т.е. ДНК и красителем. В пересчете на один нуклеотид это превышение составляет 3-4 молекулы воды. Полученный результат указывает на то, что для стабилизации комплекса необходимы дополнительные молекулы воды.

Для определения гидратноактивных атомных групп ДНК и красителя L в комплексе ДНК-L и для выяснения структурного состояния, в котором при этом находится ДНК, нами получены ИК-спектры н-ДНК, комплекса ДНК-L и красителя L в сухом состоянии и при относительных влажностях 76% и 92% в легкой и тяжелой воде. Анализ спектров в области поглощения сахарофосфатного остова ($900-1300$ см $^{-1}$) и в области поглощения кратных связей азотистых оснований в недеитерированном состоянии проводили как в работе [4] - по надежно интерпретированным полосам поглощения ДНК, весьма чувствительным к ее гидратации и конформационному состоянию.

Как известно из исследований дифракции рентгеновских лучей на ориентированных волокнах тимусной ДНК [1] и ИК-спектров пленок [4], при 76% и 92% ОВ ДНК находится в спиральных А- и В-формах, соответственно. Для структуры типа А характерно наличие поглощения азотистых оснований при 1709 см $^{-1}$ и антисимметричного колебания фосфатов PO_2^- при 1234 см $^{-1}$, а для спиральной структуры типа В, соответственно, полос с максимумами поглощения при 1714 см $^{-1}$ и 1223 см $^{-1}$ [14]. Как видно из приведенных на рис.4 ИК-спектров свободной ДНК и комплекса при 0%, 76% и 92% ОВ, эти полосы с ростом ОВ смещаются, соответственно, до 1711 см $^{-1}$ и 1227 см $^{-1}$. Эти спектральные изменения свидетельствуют о том, что фосфатные группы ДНК в комплексе связывают молекулы воды, но не до такой степени (как это имеет место для свободной ДНК [4]), чтобы в комплексе образовались канонические А- и В-формы ДНК. По-видимому, встраивание феноксазиновых колец между уотсон-криковскими парами азотистых оснований приводит к их частичному раскручиванию и изменению их сахарофосфатного остова. Но наличие полосы поглощения при 1711 см $^{-1}$ свидетельствует о том, что Н-связи в уотсон-криковских парах сохраняются. Поскольку частота колебаний фосфатов PO_2^- при 92% ОВ не достигает значения, характерного для В-формы ДНК, мы полагаем, что краун-эфирные группы красителя L связали противоионы Na^+ и тем самым препятствовали переходу дезоксирибозы в

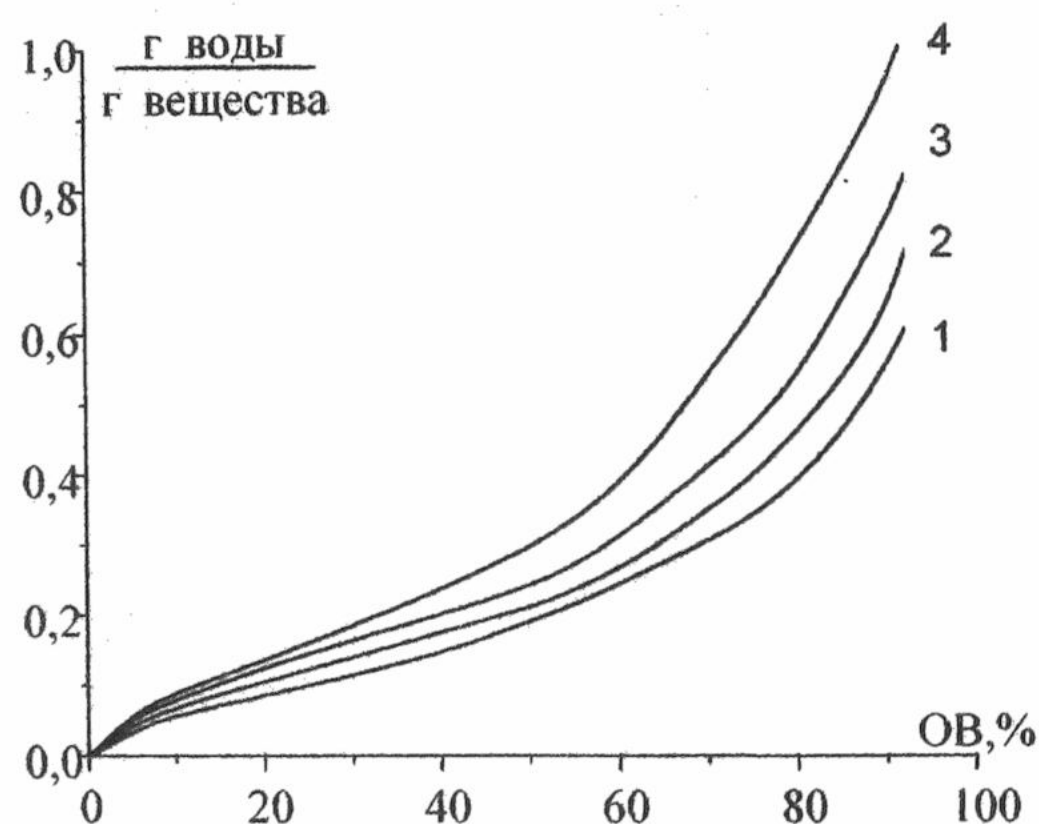


Рис.3. Изотермы гидратации: (1) - красителя L; (2) - суммарная ДНК + L; (3) - н-ДНК; (4) - комплекса ДНК-L.

Физические механизмы взаимодействия производных актиномина с ДНК ...

C_2' -эндо-конформацию. По-видимому, дальнейшее связывание воды фосфатами, как и в случае свободной ДНК, не произошло по причине образования такого комплекса: краун-эфирная группа - Na^+ - вода - фосфат PO_4^- . Смещение полос поглощения дезоксирибозы (1058 см^{-1} и 968 см^{-1} в спектре комплекса ДНК-Л в отличие от соответствующих полос 1052 см^{-1} и 970 см^{-1} в спектре н-ДНК, см. рис.4) также свидетельствует о том, что сахарофосфатный остов ДНК частично деформирован в сторону образования слабой спирали, как это мы наблюдали ранее на полинуклеотидах [4].

Для выявления влияния встраивания феноксазиновых колец в пары азотистых оснований ДНК нами были получены спектры комплекса ДНК-Л и красителя Л в дейтерированном состоянии при 0%, 76% и 92% ОВ (рис.5). Полоса $\nu = 1609\text{ см}^{-1}$ в спектре красителя, соответствующая, по-видимому, карбонильному колебанию $C_3=O$ актиноцина, в спектре сухой пленки комплекса сдвигается в высокочастотную область до 1618 см^{-1} . Это говорит о том, что указанная группа в отсутствие воды находится в неполярном окружении. При увлажнении пленки эта полоса смещается в красную область на 11 см^{-1} с одновременным ростом интенсивности, что свидетельствует о гидратации $C_3=O$ -группы актиноцина в комплексе ДНК-Л.

Полоса поглощения $\nu = 1455\text{ см}^{-1}$, связанная с деформационным колебанием атомных групп ND_2 (в C_2' -положении актиноцина), с ростом ОВ также претерпевает значительные спектральные изменения: высокочастотный сдвиг на $2-3\text{ см}^{-1}$ и увеличение интенсивности на 60%. Эти изменения, как и в случае с карбонильным колебанием, указывают на то, что молекулы воды связываются с этой группой атомов.

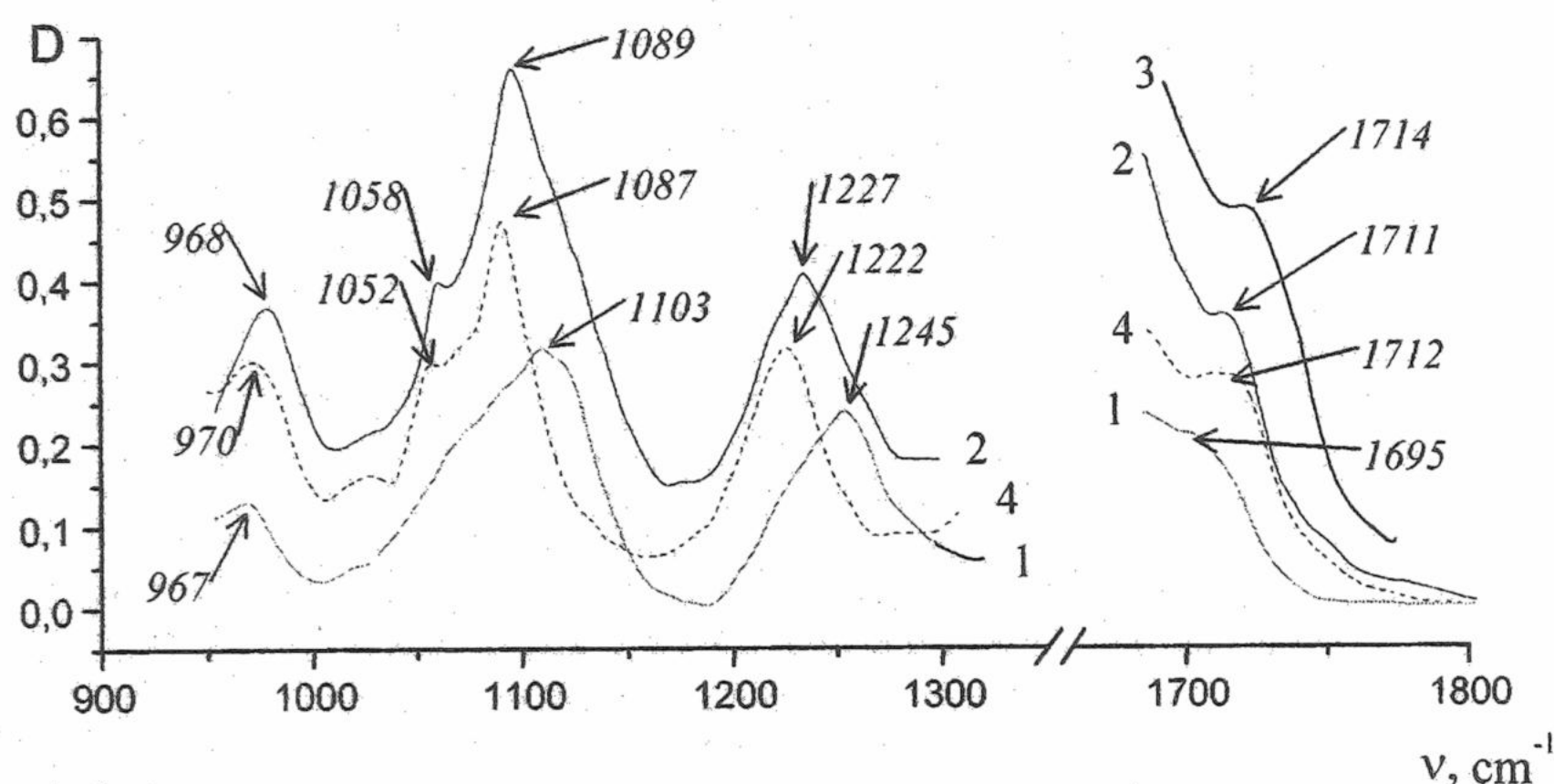


Рис.4. ИК-спектры н-ДНК и комплекса ДНК-Л в области поглощения сахарофосфатного остова ($950-1300\text{ см}^{-1}$) и в области поглощения азотистых оснований ($1680-1800\text{ см}^{-1}$) при различных значениях ОВ в H_2O : (1)–ДНК-Л, 0 % ОВ; (2)–ДНК-Л, 92 % ОВ; (3)–ДНК-Л, 76 % ОВ; (4)–н-ДНК, 92 % ОВ.

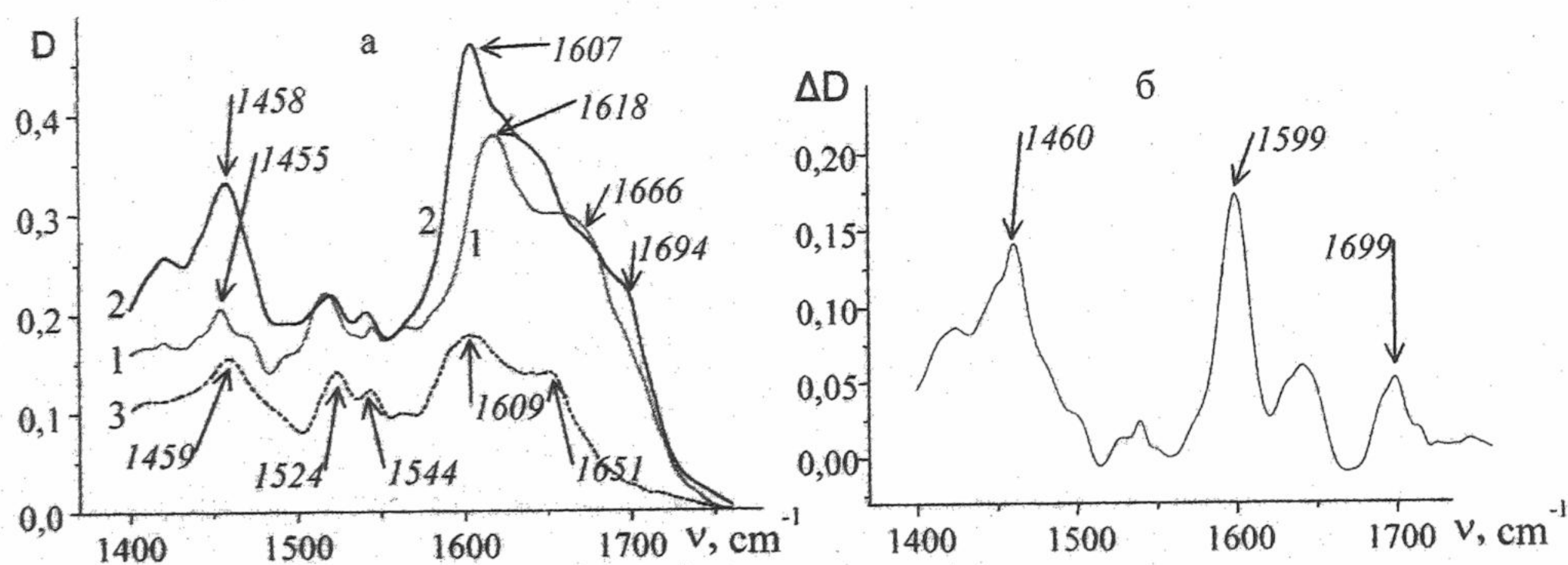
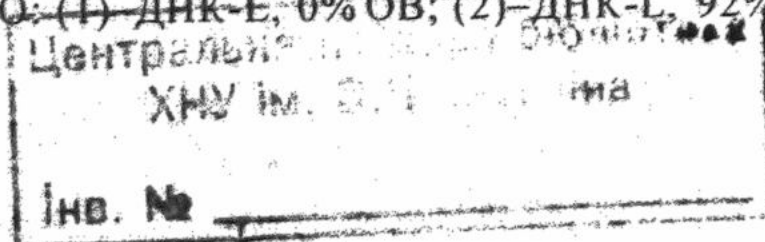


Рис.5. а) ИК-спектры комплекса ДНК-Л и красителя Л в области поглощения азотистых оснований при различных значениях ОВ в D_2O : (1)–ДНК-Л, 0% ОВ; (2)–ДНК-Л, 92% ОВ; (3)–краситель, 92% ОВ. б) Разность спектров (1) и (2).



На рис.5,6 приведен разностный спектр сухой и влажной (при 92% ОВ в D_2O) пленки комплекса, на котором хорошо видны вышеописанные спектральные изменения. Кроме того, на разностном спектре видно, что интенсивность полос поглощения карбонильных групп ДНК ($\nu = 1693 \text{ см}^{-1}$, колебание $C_2=O$ тимина и $1630-1660 \text{ см}^{-1}$, $C_6=O$ гуанина и $C_4=O$ тимина) также возрастает при сорбции воды. По-видимому, сорбированные молекулы воды, связываясь с указанными группами красителя и ДНК, образуют мостиковые структуры в гидратной оболочке комплекса, что приводит к его стабилизации. Подобная структура была обнаружена при исследовании монокристаллов динуклеотида $d(CpG)$ с профлавином методом дифракции рентгеновских лучей [5,8].

Сведения о термостабильности гидратированного комплекса получены при сравнительном исследовании кривых «плавления» н-ДНК и ДНК в комплексе с красителем L в 0,1 М растворе NaCl (рис.6). Двухступенчатый характер плавления свидетельствует о наличии двух типов связывания красителя с ДНК: слабом внешнем связывании по сахарофосфатной цепи ДНК и более прочном связывании – интеркаляции. Этот вывод согласуется и с приведенными выше спектральными данными. Приведенная на этом же рисунке температурная зависимость интенсивности поглощения красителя в комплексе ($P/D=4,0$), полученная на полосе поглощения красителя в видимой области спектра $\lambda = 448 \text{ нм}$, указывает на то, что первая стадия плавления комплекса ДНК-L в основном связана с высвобождением красителя. Сравнение температур плавления н-ДНК (74°C) и ДНК в комплексе (77°C) свидетельствует о том, что, по-видимому, гидратная структура комплекса ДНК-L стабилизирует структуру ДНК.

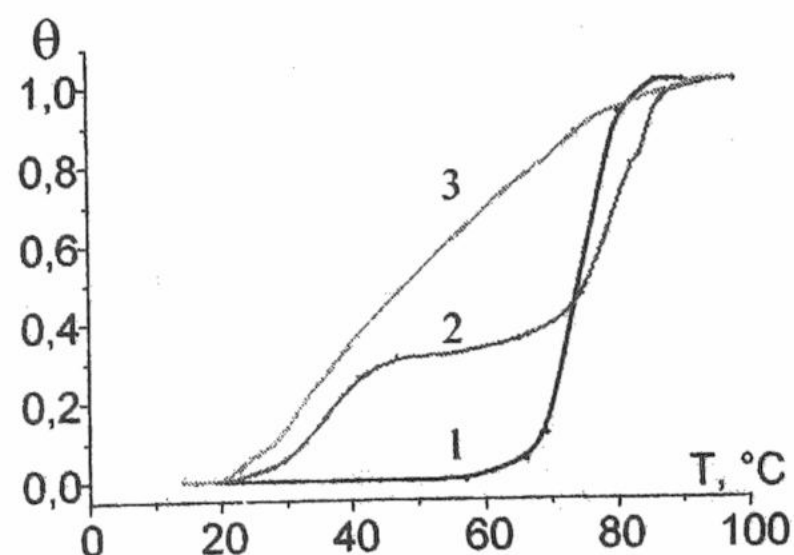


Рис.6. Кривые плавления н-ДНК (1) и комплекса ДНК-L в УФ-области спектра при $\lambda=260 \text{ нм}$ (2) и в видимой области при $\lambda=448 \text{ нм}$ (3) при $P/D = 4,0$ (0,1 М NaCl).

Таким образом, проведенные исследования влияния воды на взаимодействие краун-эфирного производного актиноина с ДНК показали, что феноксазиновое кольцо интеркалирует в уотсон-криковские пары азотистых оснований, что приводит к частичному их раскручиванию. Молекулы воды устанавливают при этом Н-связи с красителем по группам атомов $C_3=O$ и ND_2 и карбонильными группами тимина, и, по-видимому, гуанина и цитозина, образуя сплошную водородносвязанную сеть в минорном желобке ДНК. Такой комплекс более стабилен, чем «чистая» ДНК, поскольку температура плавления ДНК в составе комплекса на 3°C выше температуры плавления н-ДНК. Связывание красителя с сахарофосфатным остовом ДНК приводит к тому, что дезоксирибозное кольцо не трансформируется при 92% ОВ в C_2' -эндо-конформацию, характерную для В-формы ДНК. Надо полагать, что такие конформационные изменения обусловлены связыванием противоионов Na^+ с краун-эфирными группами. Однако в настоящее время пока неясно, какие именно молекулы красителя – слабосвязанные или интеркалированные – вступают в это взаимодействие.

Работа выполнена при финансовой поддержке по программе INTAS'97, грант 31753.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М., Мир, 1987, 584 с.
2. Jain S.C., Sobell H.M. // J. Mol. Biol. 1972, V. 68, P. 1-20.
3. Морошкина Е.Б., Кузьменко Е.А., Глибин Е.Н. // II Съезд биофизиков России. Тез. докл., М., 1999, Т. 1, С. 141-143.
4. Березняк Е.Г., Семенов М.А., Больбух Т.В. // Вісн. ХДУ №410. Біофізичний вісник 1998, Вип. 1, С. 5-20.
5. Berman H.M., Stallings W., Carell H.L. and Glusker J.P. // Biopolymers. 1979, V. 18, P. 2405-2429.
6. Dougherty G. // Analytical Biochemistry. 1981, V. 115, P. 52-57.
7. Семенов М.А., Больбух Т.В. // Биополимеры и клетка. 1987, Т. 3, № 5, С. 234-240.
8. Neidle S., Berman H.M., Shich H.S. // Nature, 1980, V. 288, P. 129-133.
9. Сухоруков Б.И., Семенов М.А., Малеев В.Я. // Биофизика. 1979, Т. 24, В. 4, С. 611-619.
10. Semenov M.A., Bolbukh T.V. // Studia Biophysika. 1982, V. 87, No. 213, P. 227-228.
11. Lober G. // J. Luminescence. 1981, V. 22, P. 221-265.
12. Dougherty G., Pigram W.J. // CRC Critical Reviews in Biochemistry. 1982, V. 12, No. 2, P. 103-132.
13. Благой Ю.П., Зозуля В.Н., Волошин И.М., Макитрук В.Л., Шаламай А.С., Щербакова А.С. // Биополимеры и клетка. 1997, Т. 13, № 1, С. 22-29.
14. Ghomi M., Letterier R., Liquier J. and Taillandier E. // J. Biochem. 1990, V. 22, No 7, P. 691-699.

УДК 541.49

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

СТАТИСТИКО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЕТЕРОАССОЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ^1H -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Д.А. Веселков¹, М.П. Евстигнеев, Д.Б. Дэвис¹, А.Н. Веселков

Кафедра физики Севастопольского государственного технического университета
Севастополь-99053, Украина; e-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

¹ Департамент химии Беркбек колледжа Лондонского университета, WCH OPP, Великобритания

Поступила в редакцию 13 марта 2000 г.

Разработана статистико-термодинамическая модель гетероассоциации ароматических молекул для интерпретации данных ЯМР-спектроскопии. В рассматриваемой модели, в отличие от предложенной ранее [12], нет ограничений на равновесные константы самоассоциации молекул, и учтены краевые эффекты, т.е. зависимость химического сдвига протонов от положения молекулы в агрегате - внутри, на краях или в гетеростыке. Модель апробирована на примере гетероассоциации фенантридинового красителя бромистого этидия (EB) и антрациклинового антибиотика дауномицина (DAU) в водном растворе. Расчет параметров ассоциации молекул проведен по данным ^1H -ЯМР-спектроскопии (500 МГц). Исследованы экспериментальные концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов взаимодействующих ароматических молекул. Установлено, что равновесная константа гетероассоциации существенно превышает константы самоассоциации EB и DAU. Анализ структурных и термодинамических характеристик комплексообразования EB и DAU указывает на возможность дополнительной стабилизации 1:1 гетеро-комплекса молекул за счет образования водородной связи между 3-аминогруппой EB и 9-MeCO группой DAU.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: статистико-термодинамическая модель, гетероассоциация, ароматические молекулы, дауномицин, бромистый этидий.

Исследования гетероассоциации биологически важных ароматических молекул представляет значительный интерес как с физико-химической точки зрения, позволяя установить влияние структуры хромофора и боковых цепей на сродство различных молекул в водном растворе, так и с медико-биологической, связанной с исследованием влияния ассоциации молекул на активность антибиотиков [1]. В работе [2] сделано предположение, что ароматические молекулы могут выступать в роли "перехватчиков" антибиотиков, связывающихся с ДНК путем интеркаляции, в частности, кофеин оказывает протекторное действие на геном клетки при комплексообразовании с ДНК интеркалирующих лигандов: бромистого этидия, доксорубицина, новатрона и др. [3]. Одно из объяснений этому явлению основано на предположении об образовании гетерокомплексов между молекулой кофеина и антибиотика в растворе, приводящих к уменьшению концентрации интеркалятора и, соответственно, его эффективности [2,3]. Таким образом, исследование процесса гетероассоциации имеет вполне конкретное медико-биологическое приложение для решения вопроса о закономерностях конкурентного связывания различных ароматических лигандов с рецепторами типа ДНК [4] или белков [5].

За последние два десятилетия было предложено несколько моделей гетероассоциации ароматических молекул. Статистико-термодинамическая модель Веллера и др. [6] рассматривает образование бесконечномерных агрегатов для само- и гетероассоциации молекул, однако она неприменима для анализа экспериментальных данных ЯМР, в частности, концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов ядер исследуемых молекул. Модель [7], разработанная для ассоциации кофеина и метил галлата, не может быть применена в общем случае, поскольку в ней используются довольно приближенные выражения для оценки равновесных мономерных концентраций одной из компонент в смешанном растворе. Моделирование процесса гетероассоциации ароматических молекул по данным оптической спектроскопии не учитывает образование n -мерных агрегатов [8], что в общем случае может привести к некорректным результатам. Введение в моделях [9,10] ограничений на размеры агрегатов (формирование лишь димерных комплексов) ароматических молекул справедливо только в области малых концентраций и относительно небольших констант ассоциации, поэтому такой подход можно рассматривать лишь как приближенный. К аналогичному выводу можно прийти в результате анализа графического метода определения параметров гетероассоциации, основанного на учете реакций димеризации и 1:1 гетероассоциации молекул, взаимодействующих в растворе [11].

Статистико-термодинамическая модель гетероассоциации, в которой молекулы образуют бесконечномерные агрегаты как для самоассоциации, так и гетероассоциации, была недавно разработана

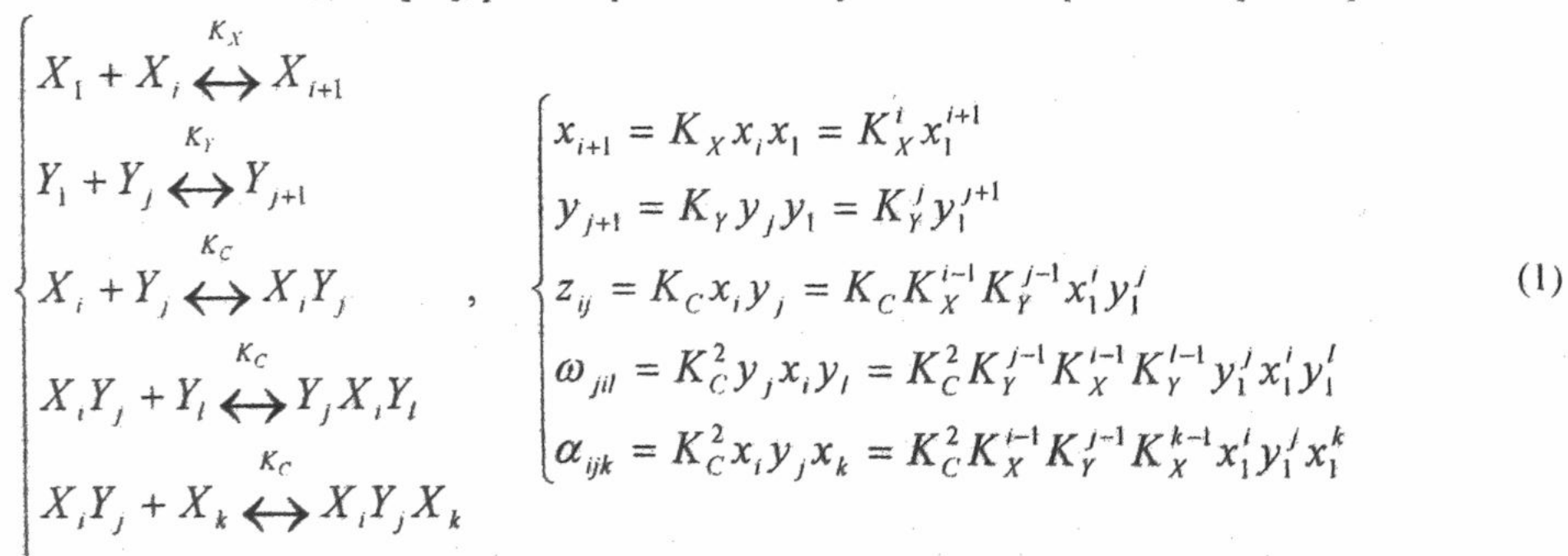
в нашей лаборатории [12] для анализа данных ЯМР ароматических молекул в смешанных растворах. Эффективность модели подтверждается, с одной стороны, совпадением результатов расчетов, выполненных с использованием разных ароматических протонов каждого из участвующих в реакциях веществ, с другой стороны - совпадением результатов расчета по независимым друг от друга экспериментальным концентрационным и температурным зависимостям протонных химических сдвигов для каждого ароматического лиганда. Однако при построении общей схемы реакций самоассоциации и гетероассоциации, обеспечивающих динамическое равновесие в растворе, одно из уравнений, описывающих гетероассоциацию с двумя "гетеро-стыками", было исключено из рассмотрения [12]. Действительно, в случае большого различия в значениях констант самоассоциации взаимодействующих веществ (в 5-6 раз, как в [12]), существование гетерокомплекса в водном растворе, состоящего из центрального агрегата - вещества с меньшей константой, фланкированного агрегатами другого вещества с большей константой, маловероятно. Однако можно заключить, что предложенная модель [12] вносит определенные ограничения на величины констант самоассоциации взаимодействующих молекул и приводит к систематической ошибке определения параметров в общем случае, когда значения равновесных констант самоассоциации молекул в смешанном растворе сравнимы по величине. Кроме этого, в модели [12] не принимается во внимание тот факт, что при суммировании комплексов с двумя гетеро-стыками, необходим учет тождественных гетероассоциатов, дающих удвоение соответствующих концентраций в равновесное распределение комплексов в растворе, а также учет влияния краевых эффектов, а именно, зависимость химического сдвига протонов от положения молекулы в агрегате - внутри, на краях или в гетеро-стыке. В последующей работе [13] нами предложена модифицированная модель гетероассоциации, в которой рассматривалась полная схема реакций без ограничений на константы само- и гетероассоциации. Последнее позволило провести корректный анализ системы краситель-антибиотик с близкими по величине константами самоассоциации ароматических молекул [13].

В настоящей работе предложена обобщенная модель гетероассоциации ароматических молекул с учетом влияния краевых эффектов при образовании различных молекулярных ассоциатов в растворе. Апробация обобщенной модели проведена на примере процесса гетероассоциации двух ароматических молекул - антиопухолевого антибиотика дауномицина (DAU) и фенантридинового красителя бромистого этидия (ЕВ), обладающего мутагенными свойствами. ЯМР-спектроскопия (500 МГц) использована для определения термодинамических и структурных параметров комплексообразования молекул, которые определялись, исходя из экспериментальных зависимостей протонных химических сдвигов молекул как функции концентрации и температуры [12,13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модель гетероассоциации

Так же как и в базовой модели [12], рассматривается следующая схема реакций в растворе:



где равновесные константы самоассоциации веществ X - K_X и Y - K_Y и константа гетероассоциации K_C полагаются независимыми от числа i, j, k, l молекул в агрегате; $x_i, y_j, z_{ij}, \omega_{jil}, \alpha_{ijk}$ - концентрации образующихся комплексов, вычисленных по закону действующих масс. Уравнение, выражающее закон сохранения массы [12], предполагает суммирование компонент по всем индексам, например, для комплекса $Y_j X_i Y_l$:

$$\sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{l=1}^{\infty} \omega_{jil} \quad (2)$$

Статистико-термодинамическая модель гетероассоциации ароматических молекул ...

Индексы j, i, l независимы друг от друга, поэтому среди слагаемых в (2) с $j \neq l$ всегда найдется пара симметричных друг другу с равными концентрациями $\omega_{jil} = \omega_{lij}$, соответствующие тождественным в растворе комплексам $Y_j X_i Y_l$ и $Y_l X_i Y_j$. Следовательно, сумма (2) должна быть скорректирована к виду:

$$\frac{1}{2} \left(\sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{l=1}^{\infty} \omega_{jil} + \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=1}^{\infty} \omega_{jij} \right). \quad (3)$$

Тогда закон сохранения массы для рассматриваемой системы можно записать следующим образом:

$$\begin{cases} x_0 = \sum_i i x_i + \sum_j \sum_i i z_{ij} + \frac{1}{2} \left(\sum_l \sum_j \sum_i i \omega_{jil} + \sum_j \sum_i i \omega_{jij} \right) + \frac{1}{2} \left(\sum_m \sum_j \sum_i (i+m) \alpha_{ijm} + \sum_j \sum_i 2i \alpha_{iji} \right) \\ y_0 = \sum_j j y_j + \sum_i \sum_j j z_{ij} + \frac{1}{2} \left(\sum_l \sum_i \sum_j (j+l) \omega_{jil} + \sum_i \sum_j 2j \omega_{jij} \right) + \frac{1}{2} \left(\sum_m \sum_i \sum_j j \alpha_{ijm} + \sum_i \sum_j j \alpha_{iji} \right) \end{cases}, \quad (4)$$

где x_0, y_0 - исходные молярные концентрации веществ X и Y . Произведя суммирование бесконечных рядов с учетом (1), можно представить закон сохранения массы в матричном виде:

$$x_0 = [K_0] \cdot [C], \quad (5)$$

где $[K_0] = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & K_X^2 x_1^2 + K_X x_1 + 2 \\ 1 - K_X x_1 & 1 - K_X x_1 & 1 - K_X x_1 & 1 - K_X^2 x_1^2 \end{pmatrix}$ - матрица коэффициентов

$[C]^T = ([X_i] \quad [X_i Y_j] \quad [Y_j X_i Y_l] \quad [X_i Y_j X_k])$ - матрица концентраций типов комплексов

$$[X_i] = \frac{x_1}{1 - K_X x_1}, \quad [Y_j] = \frac{y_1}{1 - K_Y y_1}, \quad [X_i Y_j] = K_C [X_i][Y_j]$$

$$[Y_j X_i Y_l] = \frac{K_C^2 [X_i][Y_j]^2}{1 + K_Y y_1}, \quad [X_i Y_j X_k] = \frac{K_C^2 [X_i]^2 [Y_j]}{1 + K_X x_1}$$

Система уравнений (4) симметрична относительно X и Y , и, следовательно, закон сохранения для вещества Y получается из (5) простой заменой индексов x на y и наоборот.

Анализ зависимости протонного химического сдвига молекул от концентрации и температуры раствора предполагает быстрый обмен между различными ассоциатами в масштабе времени ЯМР и учет вклада только ближайших соседних молекул в экранирование исследуемых протонов. Если агрегат образован в результате самоассоциации молекул одного сорта, то вклад соседних молекул в экранирование ядер полагается одинаковым [12]:

$$\delta_i - \delta_m = 2(\delta_d - \delta_m), \quad (6)$$

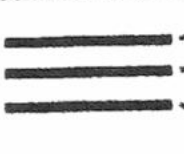
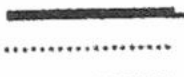
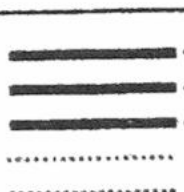
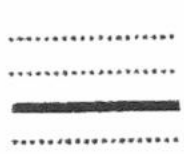
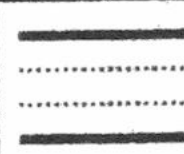
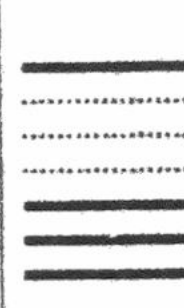
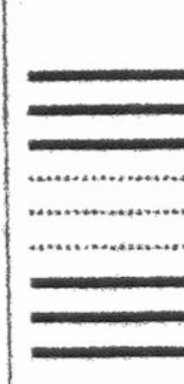
где $\delta_b, \delta_d, \delta_m$ - соответственно, химические сдвиги протона внутри самоассоциата, на краю (или в димере) и в мономере.

Для того чтобы учесть влияние положения молекулы в агрегате на химический сдвиг протонов, необходимо рассмотреть все возможные виды ее ближайшего окружения, т.е. какого типа контакты (стыки) образует молекула с соседями. Пусть $\Delta\delta_S$ и $\Delta\delta_C$ - добавки в химический сдвиг, соответственно, от соседней молекулы того же вещества (гомостык) и другого вещества (гетеростык). Тогда химический сдвиг может принимать следующие значения: а) δ_m - в мономере; б) $\delta_d = \delta_m + \Delta\delta_S$ - на краю агрегата с гомостыком; в) $\delta_C = \delta_m + \Delta\delta_C$ - на краю агрегата с гетеростыком; г) $\delta_i = \delta_m + 2\Delta\delta_S$ - внутри агрегата с двумя гомостыками; д) $\delta_{CC} = \delta_m + 2\Delta\delta_C$ - внутри агрегата с двумя гетеростыками; е) $\delta_{iC} = \delta_m + \Delta\delta_S + \Delta\delta_C = \delta_d + \Delta\delta_C$ - внутри агрегата с гетеро- и гомостыком соответственно. Принимая во внимание, что вклад в экранирование ядер дает лишь ближайшее окружение молекулы, можно привести все вероятные виды комплексов, различающиеся по химическому сдвигу (табл. 1). Тогда аддитивная модель для

наблюдаемого химического сдвига протона может быть представлена в виде суммы вкладов от различных видов комплексов:

$$\delta_X = \sum_{i=1}^9 D_i$$

Таблица 1. Возможные типы комплексов и вносимый ими химический сдвиг

Виды комплексов	Тип	Химический сдвиг, вносимый комплексом
 δ_m	X_I	$D_1 = \frac{x_1}{x_0} \delta_{mX}$
 $\delta_d = \delta_m + \Delta\delta_S$ $\delta_i = \delta_m + 2\Delta\delta_S$ $\delta_d = \delta_m + \Delta\delta_S$	X_I	$D_2 = \frac{\delta_{dX}}{x_0} \sum_2^{\infty} 2x_i + \frac{\delta_{iX}}{x_0} \sum_3^{\infty} (i-2)x_i$
 $\delta_c = \delta_m + \Delta\delta_C$	$X_I Y_j$	$D_3 = \frac{\delta_{cX}}{x_0} \sum_{j=1}^{\infty} z_{1j}$
 δ_d δ_i $\delta_{ic} = \delta_d + \Delta\delta_C$	$X_I Y_j$	$D_4 = \frac{\delta_{dX} + \Delta\delta_{cX}}{x_0} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} z_{ij} + \frac{\delta_{dX}}{x_0} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} z_{ij} + \frac{\delta_{iX}}{x_0} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=3}^{\infty} (i-2)z_{ij}$
 $\delta_{cc} = \delta_m + 2\Delta\delta_C$	$Y_j X_I Y_I$	$D_5^* = \frac{\delta_m + 2\Delta\delta_C}{2a_0} \left(\sum_{l=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \omega_{jll} + \sum_{j=1}^{\infty} \omega_{j1j} \right)$
 $\delta_{ic} = \delta_d + \Delta\delta_C$ δ_i $\delta_{ic} = \delta_d + \Delta\delta_C$	$Y_j X_I Y_I$	$D_6^* = \frac{\delta_{dX} + \Delta\delta_{cX}}{2x_0} \left[\sum_{l=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} 2\omega_{jil} + \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} 2\omega_{jij} \right] +$ $+ \frac{\delta_{iX}}{2x_0} \left[\sum_{l=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=3}^{\infty} (i-2)\omega_{jil} + \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=3}^{\infty} (i-2)\omega_{jij} \right]$
 δ_c δ_c	$X_I Y_j X_I$	$D_7 = \frac{\delta_{cX}}{x_0} \sum_{j=1}^{\infty} 2\alpha_{1j1}$
 δ_c $\delta_{ic} = \delta_d + \Delta\delta_C$ δ_i δ_d	$X_I Y_j X_k$	$D_8 = \frac{\delta_{cX}}{x_0} \sum_{k=2}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \alpha_{1jk} + \frac{\delta_{dX} + \Delta\delta_{cX}}{x_0} \sum_{k=2}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \alpha_{1jk} +$ $+ \frac{\delta_{iX}}{x_0} \sum_{k=3}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} (k-2)\alpha_{1jk} + \frac{\delta_{dX}}{x_0} \sum_{k=2}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \alpha_{1jk}$
 δ_d δ_i $\delta_{ic} = \delta_d + \Delta\delta_C$ $\delta_{ic} = \delta_d + \Delta\delta_C$ δ_i δ_d	$X_I Y_j X_k$	$D_9^* = \frac{\delta_{dX} + \Delta\delta_{cX}}{2x_0} \left[\sum_{k=2}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} 2\alpha_{ijk} + \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} 2\alpha_{iji} \right] +$ $+ \frac{\delta_{iX}}{2x_0} \left[\sum_{j=1}^{\infty} \sum_{k=3}^{\infty} \sum_{i=3}^{\infty} (i+k-4)\alpha_{ijk} + \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=3}^{\infty} (2i-4)\alpha_{iji} \right] +$ $+ \frac{\delta_{dX}}{2x_0} \left[\sum_{k=2}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} 2\alpha_{ijk} + \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{i=2}^{\infty} 2\alpha_{iji} \right]$

* - составляющая суммарного химического сдвига, в которой учитывается соотношение (3)

Статистико-термодинамическая модель гетероассоциации ароматических молекул ...

Группируя значения D_i по типам комплексов ($D_{12}(X_i)=D_1+D_2$, $D_{34}(X_iY_j)=D_3+D_4$, $D_{56}(Y_jX_iY_l)=D_5+D_6$, $D_{789}(X_iY_jX_k)=D_7+D_8+D_9$), можно записать выражение для химического сдвига вещества X в обобщенном матричном виде:

$$\delta_X = [\delta_X] \cdot [K_1] \cdot [K_2], \quad (7)$$

где

$$[\delta_X] = [\delta_{mX} \quad \delta_{dX} \quad \delta_{cX}], \quad [K_1] = \begin{bmatrix} D_{12} & D_{34} & D_{56} & D_{789} \\ 2-B_1 & 1-B_1 & -B_1 & M_1 \\ 2(B_1-1) & 2(B_1-1) & 2(B_1-1) & -2M_1 \\ 0 & 1 & 2 & 2M_2 \end{bmatrix}, \quad [K_2] = \begin{bmatrix} B_0B_1 \\ B_0B_C B_1B_2 \\ B_C^2 B_0B_1B_2^2 B_3 \\ B_C^2 B_0B_2 \end{bmatrix}$$

$$B_0 = \frac{x_1}{x_0}, \quad B_C = K_C, \quad B_1 = \frac{1}{1-K_X x_1}, \quad B_2 = \frac{y_1}{1-K_Y y_1}, \quad B_3 = \frac{1}{1+K_Y y_1}$$

$$M_1 = x_1 \left[\frac{2B_1^3}{2B_1-1} - B_1^3 + \frac{(B_1-1)^3}{B_1} - \frac{B_1^4}{(2B_1-1)^2} \right], \quad M_2 = x_1 \frac{B_1^3}{2B_1-1}$$

Очевидно, что для протонов вещества Y значение химического сдвига получается из (7) простой заменой индексов x на y и наоборот.

Удобство записи (7) состоит в следующем:

а) Вычисление произведений матриц в последовательности $\delta_X = [\delta_X] \cdot ([K_1] \cdot [K_2])$ дает три слагаемых, отражающих вклад в химический сдвиг параметров δ_{mX} , δ_{dX} , δ_{cX} :

$$\begin{aligned} \delta_X = & \delta_{mX} [B_0B_1(2-B_1) + B_0B_C B_1B_2(1-B_1) - B_C^2 B_0B_1^2 B_2^2 B_3 + B_C^2 B_0B_2 M_1] + \\ & + \delta_{dX} [2B_0B_1(B_1-1) + 2B_0B_C B_1B_2(B_1-1) + 2B_C^2 B_0B_1B_2^2 B_3(B_1-1) - 2B_C^2 B_0B_2 M_1] + \\ & + \delta_{cX} [B_0B_C B_1B_2 + 2B_C^2 B_0B_1B_2^2 B_3 + 2B_C^2 B_0B_2 M_2] \end{aligned}$$

б) Вычисление произведений в последовательности $\delta_X = ([\delta_X] \cdot [K_1]) \cdot [K_2]$ дает четыре слагаемых, отражающих влияние на химический сдвиг конкретных типов комплексов - $D_{12}(X_i)$, $D_{34}(X_iY_j)$, $D_{56}(Y_jX_iY_l)$, $D_{789}(X_iY_jX_k)$:

$$\begin{aligned} \delta_X = & B_0B_1 [\delta_{mX}(2-B_1) + 2\delta_{dX}(B_1-1)] + B_0B_C B_1B_2 [\delta_{mX}(1-B_1) + 2\delta_{dX}(B_1-1) + \delta_{cX}] + \\ & + B_C^2 B_0B_1B_2^2 B_3 [-\delta_{mX}B_1 + 2\delta_{dX}(B_1-1) + 2\delta_{cX}] + B_C^2 B_0B_2 [\delta_{mX}M_1 - 2\delta_{dX}M_1 + 2\delta_{cX}M_2] \end{aligned}$$

Вычислительная процедура нахождения параметров модели соответствует описанной ранее [12]. Входными данными являются экспериментальные концентрационные и температурные зависимости химических сдвигов ароматических протонов исследуемого вещества, а также результат расчета параметров самоассоциации обоих веществ: δ_{mX} , δ_{dX} , K_X ; δ_{mY} , δ_{dY} , K_Y ; выходными - δ_{cX} , δ_{cY} , K_C и энтальпия (ΔH), энтропия (ΔS), определяемые исходя из концентрационных и температурных зависимостей соответственно. Квадратичная функция невязки между экспериментальными и теоретическими значениями химического сдвига выступает целевой функцией процедуры минимизации по выходным параметрам, при этом на каждом цикле итерации решается система уравнений (5) для обоих веществ относительно x_i и y_i , которые в дальнейшем используются в (7).

ЯМР эксперимент

Методика эксперимента. Бромистый этидий и дауномицин фирмы "Sigma" использовали без дополнительной очистки, растворяли в D_2O с изотопной чистотой 99.95% D ("Sigma") и лиофилизировали. Растворы готовили путем добавления взвешенного количества образца в дейтерированном 0.1M фосфатном буфере (pD 7.1), содержащем 10^{-4} моль/л ЭДТА. Концентрацию

ароматических молекул в водном растворе определяли спектрофотометрически - для бромистого этидия коэффициент экстинкции $\epsilon=5860 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ($\lambda=480 \text{ нм}$) [14], для DAU - $\epsilon=11500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ($\lambda=477 \text{ нм}$) [16].

^1H - и ^2M - ^1H -ЯМР спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при температурах 303K (рис. 1а) и 313K; температурные зависимости химических сдвигов протонов ароматических лигандов измерены в диапазоне температур от 298K до 343K (рис. 1б). Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфо́кислота), в качестве внутреннего стандарта использовался бромид тетраметиламмония (ТМА). Отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР, отождествление химических и пространственных связей проводили, соответственно, с помощью двумерных гомоядерных TOCSY и ROESY экспериментов. Методика приготовления образцов и проведения экспериментов описана в [15].

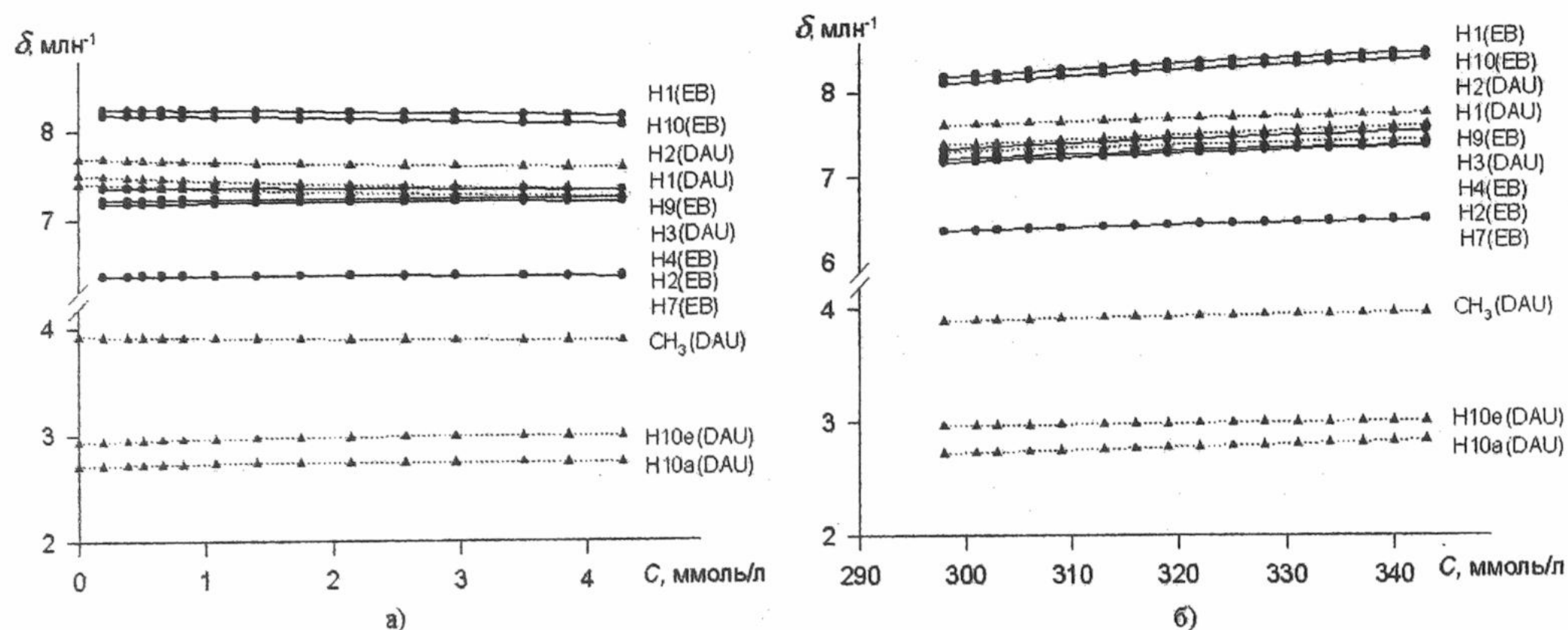


Рис.1 Гетероассоциация EB и DAU в 0.1M фосфатном буфере, pD 7.1. Зависимости химических сдвигов протонов ароматических лигандов в смешанном растворе от а) - концентрации EB при $T=303\text{K}$ ($y_0=0.8 \text{ mM}$); б) - температуры ($x_0=1.75 \text{ mM}$, $y_0=0.8 \text{ mM}$).

Анализ результатов эксперимента. Структурные и термодинамические параметры гетероассоциации EB и DAU определяли путем анализа зависимостей химических сдвигов необменивающихся протонов обоих ароматических соединений в смешанном растворе от концентрации и температуры по описанной выше модели. В расчетах использованы параметры самоассоциации δ_{mX} , δ_{dX} , K_X и δ_{mY} , δ_{dY} , K_Y , определенные для EB и DAU ранее [16,17] в идентичных экспериментальных условиях. Результаты расчетов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Параметры гетероассоциации EB (X) и DAU (Y) в 0.1 моль/л фосфатном буфере, pD 7.1

T, К	Протоны X	$\delta_{CX},$ млн ⁻¹	Протоны Y	$\delta_{CY},$ млн ⁻¹	$K_C,$ л/моль	$-\Delta H,$ кДж/моль	$-\Delta S,$ Дж/К моль
303	H1	8.01	H2	7.59	1310±30	33.2±3.4	49±11
$K_X=270\pm20$ $K_Y=580\pm110$	H10	7.96	H1	7.29			
	H9	7.21	H3	7.26			
	H4	7.07	OCH ₃	3.88			
	H2	7.03	H10e	2.97			
	H7	6.24	H10a	2.73			
313	H1	8.04	H2	7.60	970±50		
$K_X=200\pm20$ $K_Y=380\pm90$	H10	7.98	H1	7.30			
	H9	7.25	H3	7.26			
	H4	7.08	OCH ₃	3.89			
	H2	7.03	H10e	2.97			
	H7	6.25	H10a	2.77			

Из табл. 2 видно, что величина константы гетероассоциации комплексообразования EB с DAU существенно выше равновесных констант самоассоциации каждой из взаимодействующих молекул. Это означает, что формирование EB-DAU гетеро-комплексов энергетически более выгодно по сравнению с

самоассоциацией этих молекул. Подобное соотношение равновесных констант самоассоциации и гетероассоциации было обнаружено и для системы профлавин(PF)-дауномицин в водном растворе [13]. Анализ межмолекулярных NOE контактов, термодинамических параметров комплексообразования молекул и структуры димерного комплекса PF-DAU позволяет сделать заключение [13] о дополнительной (к Ван-дер-Ваальсовым и гидрофобным взаимодействиям) стабилизации 1:1 гетеро-комплекса за счет образования водородной связи между 3,6-аминогруппой акридинового хромофора PF и группой 9-MeCO DAU. Можно предположить, что гетеро-комплекс EB-DAU также стабилизируется водородной связью между 3-аминогруппой фенантридинового хромофора красителя и группой 9-MeCO антибиотика. Последнее позволяет объяснить относительно высокие отрицательные значения энтальпии гетероассоциации красителя и антибиотика. Образование водородной связи приводит к отрицательным значениям ΔH и ΔS [18,19]. Энтальпия образования водородной связи в водном растворе по различным оценкам находится в пределах от -8 до -13 кДж/моль [18]. Однако прямой ЯМР эксперимент по определению водородной связи в EB-DAU гетеро-комплексе в 90% H_2O/D_2O растворе не дал однозначного результата из-за уширения резонансного сигнала NH_2 , связанного, по-видимому, с промежуточным химическим обменом молекул и сложным молекулярным равновесием в растворе, включающем формирование водородных связей через молекулы воды в самоассоциированных агрегатах EB.

Следует также отметить существенный вклад дисперсионных взаимодействий, характеризующихся отрицательной энтальпией и энтропией [18], при образовании 1:1 гетерокомплекса ароматических молекул в водном растворе.

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр "Bruker DRX" (500 МГц).

Работа частично финансировалась Международной программой INTAS (грант INTAS-97-31753).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adel A.L., Dorr R.T., Liddil J.D. // *Cancer Investigation*. 1993. V.11. P.15.
2. Larsen R.W., Jasuja R., Hetzler R.K., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. // *Biophys. J.* 1996. V.70. P.443.
3. Traganos F., Kapuscinsky J., and Darzynkiewicz Z. // *Cancer Res.* 1991. V.51. P.3682.
4. Pal M.K., Ghosh J.K. // *Spectrochim. Acta*. 1995. V.51A. P.489.
5. Wang H., Zou H., Zhang Y. // *Anal. Chem.* 1998. V.70. 373.
6. Weller K., Shutz H., Petri I. // *Biophys. Chem.* 1984. V.19. 289.
7. Baxter N.J., Williamson M.P., Lilley T.H., Haslam E. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V.92. 231.
8. Kapuscinsky J., Kimmel M. // *Biophys. Chem.* 1993. V.46. 153.
9. Aradi F., Foldesi A. // *Magn. Res. Chem.* 1985. V.23. 375.
10. Aradi F., Foldesi A. // *Magn. Res. Chem.* 1989. V.27. 249.
11. Chen J.-S., Shiao J.-Ch. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1994. V.90. 429.
12. Davies D.B., Veselkov D.A., Veselkov A.N. // *Molecular Physics*. 1999. V.97. 439.
13. Veselkov D.A., Kodintsev V.V., Evstigneev M.P., Davies D.B., Veselkov A.N. // *Physics of Alive* (in press).
14. Bresloff J.L., Crothers D.M. // *J. Mol. Biol.* 1975. V.95. 103.
15. Remeta D.P., Mudd P., Berger R.L., Breslauer K.J. // *Biochemistry*. 1991. V.30. P.9799.
16. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V.92(3). P.383.
17. Итон Р.Д., Веселков Д.А., Барановский С.Ф., Осетров С.Г., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н. // *Хим. физика*. 2000. Т.19. №2. С. 98.
18. Ross P.D., Subramanian S. // *Biochemistry*. 1981. V.20. P.3096.
19. Record M.T.Jr., Anderson C.F., Lohman T.M. // *Quart. Rev. Biophys.* 1978. V.11. P.103.

УДК 577.32

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ МЕТОДОМ МОНТЕ КАРЛО. 3. РОЛЬ ВОДЫ В СТАБИЛИЗАЦИИ СПИРАЛЬНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

А.В. Шестопалова, Д.Б. Анищенко*, В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 61085, Харьков; *Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 61077, Харьков

Статья поступила в редакцию 30 марта 2000 г.

Впервые методом Монте Карло на молекулярном уровне проведено изучение гидратации структурных компонентов полирибоцитидиловой кислоты - polyrC . Описано гидратное окружение рибозы и фосфатных групп, входящих в состав нейтральной и протонированной формы цитидинмонофосфатов. Проведен анализ энергетических и структурных характеристик систем, содержащих динуклеозидмонофосфаты цитозина и 200 молекул воды. Построены одно- и двухцепочечные тетрануклеотиды нейтральной и полупротонированной форм polyrC . На основе результатов изучения гидратного окружения таких тетрануклеотидов предложена схема образования упорядоченных водных мостиков и цепочек, стабилизирующих спиральную структуру polyrC .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитидинмонофосфат, полирибоцитидиловая кислота, гидратация, моделирование методом Монте Карло.

В представляемой работе приведены результаты изучения водного окружения структурных компонентов полирибоцитидиловой кислоты (polyrC), полученные с помощью метода Монте Карло. В наших предыдущих работах [1,2] было исследовано влияние протонирования цитозина по N3 положению на изменение водного окружения простейших структурных элементов polyrC - мономерной и ассоциированных молекул цитозина в нейтральной и протонированной формах. Рассмотрение более сложных компонентов polyrC необходимо для выяснения роли растворителя в формировании и стабилизации односпиральной нейтральной формы polyrC , образующейся при pH 7, и двухспиральной полупротонированной формы polyrC-polyrC^+ , существующей при pH 4 - 5 [3-7]. Было высказано предположение [5,6], что в одноцепочечной спирали polyrC нет никаких явных стабилизирующих факторов, кроме стэкинга оснований и стерических ограничений, которые налагает стандартная геометрия нуклеотидов на геометрию сахарофосфатного остова. Неоднократно обсуждалась возможность стабилизации polyrC за счет образования водородной (H-) связи O2'-H...O4' между соседними нуклеотидами (см., например, [3,6]). Такая связь могла бы образоваться только при помощи водных мостиков, поскольку расстояние O2'-H...O4' больше, чем длина H-связи. Кроме того, согласно данным экспериментов, формирование одно- и двухцепочечных структур polyrC во влажных пленках происходит при различных значениях относительной влажности, и количество воды, связанной с обеими структурными формами polyrC в растворе, также различается [8,9]. Поэтому исследование взаимодействия компонентов полирибоцитидиловой кислоты с растворителем, проведенное методом Монте Карло, позволит на молекулярном уровне изучить роль водного окружения в стабилизации спиральных структур polyrC .

ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы было изучение гидратации нейтрального ($r\text{CMP}$) и протонированного ($r\text{C}^+\text{MP}$) цитидинмонофосфата, их водородносвязанной (BC-) пары $r\text{CMP}...r\text{C}^+\text{MP}$, динуклеозидмонофосфата (DMP) цитозина $r\text{C-P-rC}$, тетрануклеотида цитозина в односпиральной форме (polyrC) и дуплекса полупротонированного тетрануклеотида в двухспиральной форме (polyrC-polyrC^+). Для описания этих процессов на молекулярном уровне необходимо получить энергетические и структурные характеристики систем, содержащих изучаемые соединения и молекулы растворителя. Поэтому нами использовался компьютерный метод Монте Карло, позволяющий получить такие характеристики, а также мгновенные картинки, необходимые при построении моделей гидратного окружения исследуемых молекул. Применение метода Монте Карло для изучения гидратации биомолекул с использованием алгоритма Метрополиса [10] подробно описано в работах [11-13].

Конформации нуклеотидов - цитидинмонофосфатов ($r\text{CMP}$) в нейтральной и протонированной форме - соответствуют данным рентгеноструктурного анализа о структуре односпиральной polyrC , которая принадлежит к А-семейству со стандартной C_3' -эндо конформацией сахара [5]. Конфигурация BC-пары

Изучение гидратации структурных форм полирибозитидиловой кислоты ...

$r\text{CMP} \dots r\text{C}^+\text{MP}$ соответствует конфигурации нуклеозидмонофосфатов противоположных цепей двойной спирали полупротонированной polyrC , у которой ось симметрии второго порядка совпадает с осью спирали и поэтому имеет место параллельная ориентация цепей [3,6]. DMP $r\text{C-P-rC}$ находится в конформации, соответствующей положению двух соседних нуклеотидов в одноцепочечной polyrC , у которой помимо стандартной C_3' -эндо конформации сахара все торсионные углы близки к значениям этих углов у А-ДНК, за исключением угла вращения ϵ вокруг $\text{C}_3'-\text{O}_3'$ связи (Табл.1), а расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет $3.11\text{\AA}$ [5]. На основе этих данных нами с помощью программы молекулярного моделирования HyperChem5 была построена пространственная модель тетрануклеотида одноцепочечной polyrC (рис.1).

Таблица 1. Значения торсионных углов для односпиральной polyrC и А-формы ДНК.

Системы \ Углы	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
polyrC	-57	173	47	83	-129	-65	-159
А-ДНК	-50	172	41	79	-146	-78	-154

Гомополимер polyrC при низких рН может существовать в виде двойной спирали с параллельными цепями и наполовину протонированными парами $\text{C} \dots \text{CH}^+$. Langridge и Rich [7] по рентгеновской дифракции на волокнах polyrC , полученных при рН 5.0, предложили двухспиральную структуру polyrC-polyrC^+ с 12 парами оснований на виток и расстоянием между ними $3.11\text{\AA}$. Более поздние работы как опровергали эти данные [5], так и подтверждали их [6]. Но данных о пространственной структуре (координаты атомов, торсионные углы) из-за размытости рефлексов на рентгенограмме волокон аммониевой соли polyrC получено не было. Нами с помощью программы молекулярного моделирования HyperChem5 и последующим уточнением координат атомов методом Монте Карло была построена модель тетрануклеотида двойной спирали с параллельными цепями, принадлежащая к В-семейству (рис.2). Основанием послужили данные о существовании оси симметрии C_2 , лежащей между парами оснований и совпадающей с осью спирали [6]. Также учитывалось характерное для полинуклеотидов этого семейства большое структурное многообразие, которое позволяет сформировать подобную структуру.

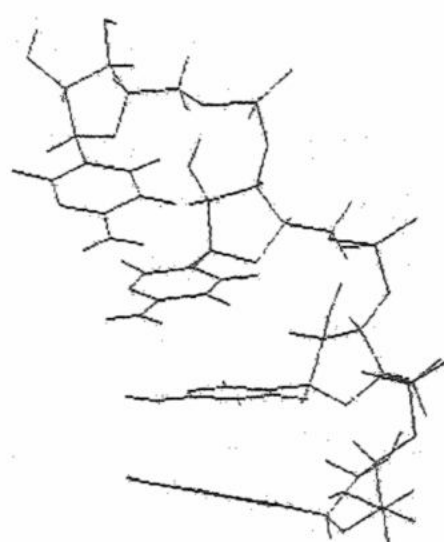


Рис.1. Односпиральная polyrC .

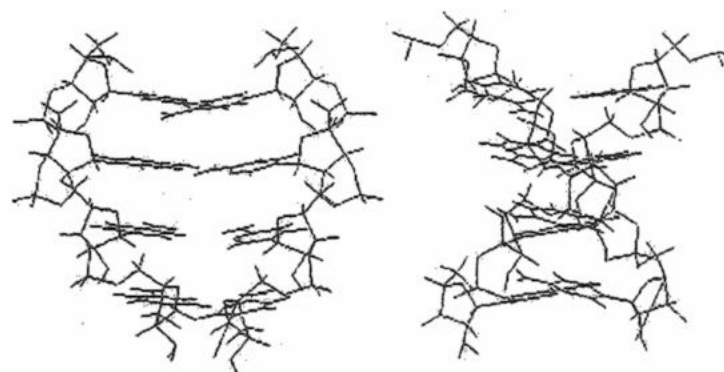


Рис.2. Две проекции polyrC-polyrC^+ .

Для решения стоящей перед нами задачи - определения роли воды в стабилизации структурных компонентов polyrC - мы изучали фиксированные конформации тетрануклеотида polyrC и его дуплекса. В действительности, для корректного расчета энергетических характеристик рассматриваемых нами систем необходимо проводить полный конформационный анализ, который требует определения минимума конформационной энергии по многим параметрам. Чтобы упростить задачу, мы изучили и сравнили более простые системы: ВС-пару нейтрального и протонированного СМР и DMP с фиксированными и изменяющимися параметрами связей.

В случае ВС-пары два СМР смещались друг относительно друга в рамках алгоритма Метрополиса [10], тогда как конформации сахарофосфатного остова, длины связей и величины валентных углов в процессе расчета не изменялись. При расчете конформационной энергии DMP мы рассматривали изменение основных торсионных углов и блоков, на которые разделен DMP. Полное число связей в динуклеотиде, вокруг которых возможно вращение, в наших расчетах равно 10. Это углы вращения вокруг связей $\text{C}_1'-\text{N}_1$ (2 угла), $\text{C}_3'-\text{O}_3'$ (2), $\text{C}_4'-\text{C}_5'$ (2), $\text{C}_5'-\text{O}_5'$ (2), $\text{P-O}_3'$ и $\text{P-O}_5'$. DMP разделен на семь блоков: "хвост" $\text{HO}_5'-\text{C}_5'$, две рибозы, фосфатная группа $\text{O}_3'-\text{PO}_2-\text{O}_5'$, "хвост" $\text{C}_3'-\text{O}_3'\text{H}$ и два цитозина. Полная конформационная энергия DMP рассчитывалась как сумма энергий взаимодействий между отдельными блоками. Амплитуда изменения торсионных углов составляет $0.1-0.3^\circ$ в зависимости от типа угла вращения. Как показывает проведенное в разделе "Результаты и обсуждение" сравнение результатов,

полученных для ВС-пары и DMP с фиксированной и изменяющейся геометрией, введение конформационной энергии в расчет энергетических характеристик в рамках нашей задачи не имеет существенного значения. Поэтому мы можем ограничиться рассмотрением фиксированных конфигураций тетрануклеотида и его дуплекса. Выбор нами тетрануклеотидов определяется тем, что именно для такого числа нуклеотидов возможно формирование водных цепочек, стабилизирующих спирали polyrC и повторяющихся через каждые 4 нуклеотида [7,14].

В расчетах исследуемое соединение и молекулы воды помещались в центр сферы с жесткими отражательными стенками. Радиус выбирался таким, чтобы объем сферы, необходимый для создания нормальной плотности раствора, был в несколько раз меньше используемого. Радиусы сфер в наших расчетах составляли 25 - 35Å. Расчеты проводились при температуре 298K. Для расчетов энергии межмолекулярных взаимодействий вода-основание и основание-основание использовался модифицированный потенциал Леннарда-Джонса 1-6-12, с параметрами, полученными Полтевым с соавторами [15,16], а для расчетов взаимодействий вода-вода - полуэмпирический потенциал 1-6-expr. [17]. Протонирование учитывалось посредством модификации частичных атомных зарядов, рассчитанных нами методом AM1 [18] для rCMP и rC⁺MP.

Нуклеозидмонофосфаты в растворе при физиологических условиях заряжены отрицательно из-за полной ионизации фосфатных групп. Нейтрализация заряда на фосфатных группах осуществляется за счет контурных ионов, находящихся в растворе. Как правило, это ионы Na⁺. В наших расчетах ионы в явном виде не учитывались, но заряды на фосфатных группах были рассчитаны так, чтобы сохранить условия электронейтральности. Такое приближение широко используется при конформационном анализе нуклеиновых кислот и их фрагментов [16] и при изучении гидратации ди- и олигонуклеотидов методом Монте Карло [13,19].

Для установления равновесного состояния каждой системы длина генерируемой марковской цепи составляла 4×10^6 элементарных конфигураций. Статистическая ошибка при вычислении термодинамических величин в наших расчетах была порядка ± 0.005 для соединений с фиксированной геометрией и ± 0.007 для соединений с изменяющейся геометрией. Чтобы достичь такой точности вычислений, длины генерируемых марковских цепей составляли 4×10^6 элементарных конфигураций для систем с фиксированной геометрией и 6×10^6 для систем с изменяющейся геометрией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Системы rCMP, rC⁺MP, rCMP...rC⁺MP, rC-P-rC + H₂O. При изучении данных систем одной из основных задач, помимо исследования различия гидратации нейтральной и протонированной форм CMP, было описание гидратации элементов сахарофосфатного остова (рибоза и фосфатные группы) и возможного отличия его гидратации при протонировании основания нуклеозидмонофосфата. Энергетические характеристики исследованных систем представлены в таблице 2. Здесь U_{SUM} - полная средняя энергия взаимодействия в системе, U_{WW} - средняя энергия взаимодействия вода-вода, U_{WB} - средняя энергия взаимодействия вода-основание, U_{BB} - средняя энергия взаимодействия rCMP...rC⁺MP, U_{WW/I} и U_{SUM/I} - удельные значения энергий взаимодействия вода-вода и полной энергии систем, N_{BC} - число молекул воды, образующих Н-связи с исследуемым веществом. После таблицы приведены значения средних энергий взаимодействия rCMP...rC⁺MP U_{BB} для ВС-пары: а. - с фиксированной геометрией, б. - с изменяющейся геометрией и средних конформационных энергий U_{CONF} для DMP с а. - фиксированной и б. - изменяющейся геометрией.

Таблица 2. Энергетические характеристики систем rCMP, rC⁺MP, ВС-пар rCMP...rC⁺MP, DMP rC - P - rC в кластере из 200 молекул воды.

Система	U _{SUM} ккал/моль	U _{SUM/I} ккал/моль	U _{WW} ккал/моль	U _{WW/I} ккал/моль	U _{WB} ккал/моль	N _{BC}
rCMP	-1635.5	-8.178 ± 0.005	-1518.6	-7.593	-116.9	9 H ₂ O
rC ⁺ MP	-1637.1	-8.185 ± 0.005	-1505.5	-7.527	-131.6	10 H ₂ O
rCMP ... rC ⁺ MP	a. -1688.3	-8.441 ± 0.005	-1444.2	-7.221	-217.2	13 H ₂ O
	b. -1690.6	-8.453 ± 0.007	-1437.5	-7.187	-240.5	16 H ₂ O
rC - P - rC	a. -1812.2	-9.061 ± 0.005	-1481.0	-7.405	-227.3	14 H ₂ O
	b. -1787.4	-8.937 ± 0.007	-1459.6	-7.298	-229.2	14 H ₂ O
H ₂ O		-7.956 ± 0.005	-1591.2	-7.956		

U_{BB} rCMP...rC⁺MP: а. = -26.9 ккал/моль; б. = -12.7 ккал/моль.

U_{CONF} rC-P-rC: а. = -103.9 ккал/моль; б. = -98.6 ккал/моль.

Изучение гидратации структурных форм полирибозитидиловой кислоты ...

Из сравнения величин полных энергий систем $r\text{CMP}$ и $r\text{C}^+\text{MP}$ видно, что системы отличаются незначительно, некоторая энергетическая предпочтительность системы, содержащей $r\text{C}^+\text{MP}$, определяется несколько более выгодным взаимодействием протонированной формы $r\text{CMP}$ с водой.

Анализ мгновенных конфигураций показывает, что 9 молекул воды образуют Н-связи с $r\text{CMP}$, 10 - с $r\text{C}^+\text{MP}$. С нейтральным цитозином Н-связи образуют 4, а с протонированным цитозином - 5 молекул воды. Центры гидратации остаются теми же, что и у мономеров цитозина (это $\text{C}_2=\text{O}$, N_3 или N_3H , N_4H_2 группы). С рибозой и фосфатом связываются 5 молекул воды, из них 3 молекулы воды образуют Н-связи с атомами кислорода фосфатной группы, 3 молекулы воды - с атомами O_2' , O_3' и O_4' рибозы, при этом 1 молекула воды занимает мостиковое положение между кислородом фосфатной группы и O_3' атомом рибозы. Очевидно, протонирование цитозина по N_3 положению не влияет на гидратацию элементов сахарофосфатного остова.

Анализ энергетических характеристик систем, содержащих ВС-пары и DMP цитозина (табл.2), позволяет сделать вывод о энергетической предпочтительности систем, содержащих DMP. Такая предпочтительность определяется как лучшей структурой воды вокруг DMP цитозина, так и лучшим взаимодействием его с молекулами воды. Исключение составляет ВС-пара с изменяющейся геометрией, для которой энергия взаимодействия вода-ВС-пара U_{WB} наибольшая (по абсолютной величине). Анализ равновесных конфигураций ВС-пары с изменяющейся геометрией показывает (Рис.3а, б), что два CMP не сохраняют Н-связи между собой, поскольку расстояния между группами C_2O , N_4H_2 и N_3 (N_3H) увеличиваются до 3.8-4.0Å. Эти группы становятся доступными для молекул воды, которые образуют с ними Н-связи. Число молекул воды, взаимодействующих с отдельными монофосфатами, увеличивается. Увеличивается (по абсолютной величине) и полная энергия взаимодействия U_{WB} . Обнаружен один водный мостик между двумя остатками цитозина.

У ВС-пары с фиксированной геометрией шесть гидрофильных групп цитозина недоступны для молекул H_2O , так как образуют Н-связи между собой. Поэтому число гидратации ВС-пары неаддитивно: с $r\text{CMP} \dots r\text{C}^+\text{MP}$ водородные связи образуют 13, а не 19 молекул воды (рис.3а). Для этой пары найдены 2 водных мостика, которые соединяют цитозины в паре, располагаясь над или под группами C_2O , N_3 , N_3H и N_4H_2 нейтрального и протонированного цитидинмонофосфатов.

С DMP, имеющим фиксированную конформацию, Н-связи образуют 14 молекул воды, из них с элементом сахарофосфатного остова (две рибозы и одна фосфатная группа, связывающая нуклеозиды цитозина) - 5 молекул воды. Некоторые молекулы воды расположены между N_4H_2 , C_2O , N_3 группами двух цитозинов, образуя 4 мостика. (Рис.4а). То есть, на уровне простых компонентов различных структурных форм polyrC найдены такие молекулы воды, которые могут принимать участие в стабилизации как одно-, так и двухцепочечных спиралей polyrC .

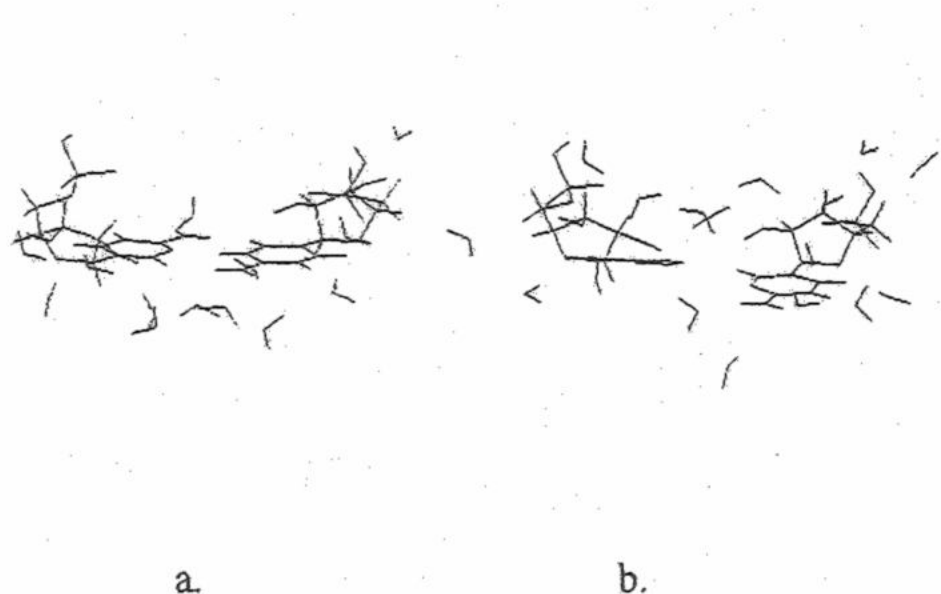


Рис.3. Мгновенные конфигурации систем, содержащих $r\text{CMP} \dots r\text{C}^+\text{MP}$, имеющих: а.-фиксированную геометрию, б. - изменяющуюся геометрию, и молекулы воды, образующие Н-связи с ними.

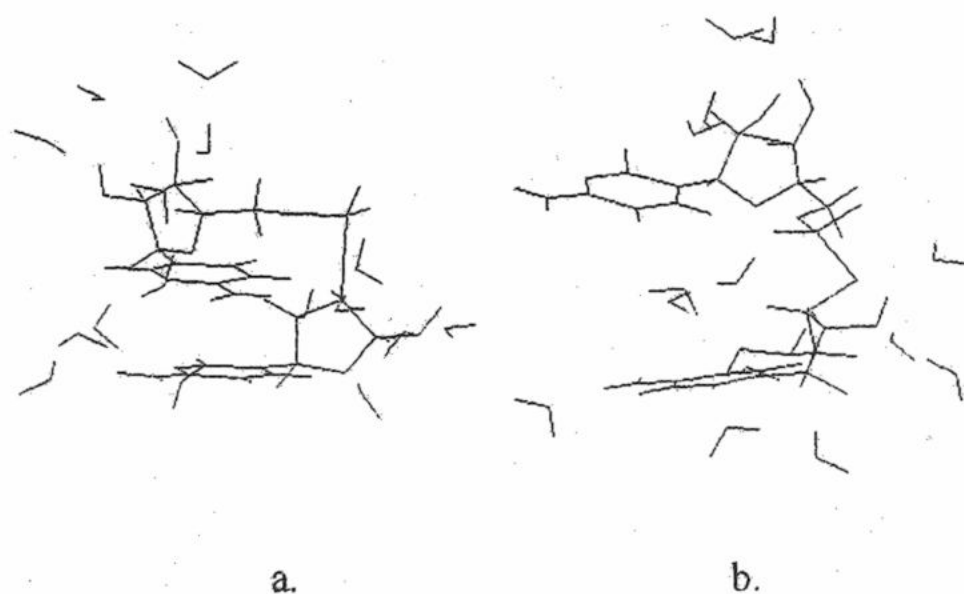


Рис.4. Мгновенные конфигурации систем, содержащих $r\text{C-P-rC}$, имеющих: а.-фиксированную геометрию, б. - изменяющуюся геометрию, и молекулы воды, образующие Н-связи с ними.

Для DMP с изменяющейся конформацией (Рис.4б) характерна "раскрытая" конфигурация, у которой увеличилось расстояние между плоскостями оснований и уменьшилось их перекрытие. Для такого DMP не найдено водных мостиков, связывающих гидрофильные группы двух цитозинов. Все мостиковые положения молекулы воды занимают между кислородами фосфатной группы и рибозы, а также между гидрофильными группами каждого из цитозинов. Такая конфигурация не похожа на конфигурацию, которую имеют цитозины в цепи одно- или двухцепочечной polyrC . Поэтому, учитывая наличие стерических ограничений при формировании протяженных спиральных структур, которые уменьшают подвижность нуклеотидов вдоль цепи и в противоположных цепях, мы в дальнейшем рассмотрим фрагменты одно- и двухцепочечной polyrC с фиксированными конфигурациями.

Системы $\text{polyrC}+\text{H}_2\text{O}$ и $\text{polyrC-polyrC}^++\text{H}_2\text{O}$. Энергетические характеристики систем polyrC и polyrC-polyrC^+ приведены в таблице 3 (обозначения описаны ранее для табл.2). Из результатов, приведенных в табл.3 видно, что структура воды вблизи обеих спиральных форм polyrC сильно разрушена. Анализ данных табл. 3 и результаты расчетов для динуклеотида позволяет сделать вывод о том, что стабильность рассматриваемых систем в большей степени определяется взаимодействием с водным окружением, чем другими типами взаимодействий. Так, стэкинг-взаимодействие остатков цитозинов, расположенных вдоль цепи (взаимодействие между плоскостями цитозинов), полученное для DMP с фиксированной геометрией, дестабилизирует структуру. Оно составляет $\sim +2.8$ ккал/моль для двух соседних в цепи цитозинов (или около $+4.5$ ккал/моль для DMP с изменяющейся геометрией). Межцепочечное взаимодействие (энергия $U_{\text{ВВ}}$) стабилизирует систему polyrC-polyrC^+ , но значение $U_{\text{ВВ}}$ составляет только $\sim 2,5\%$ всей энергии системы.

Таблица 3. Энергетические характеристики односпирального тетра nukлеотида polyrC и двухспирального тетра nukлеотида polyrC-polyrC^+ в кластерах из 400 молекул воды

Система	U_{SUM} , ккал/моль	$U_{\text{SUM}/1}$, ккал/моль	U_{WW} , ккал/моль	$U_{\text{WW}/1}$, ккал/моль	U_{WB} , ккал/моль
polyrC	-3410.8	-8.525 ± 0.005	-2934.8	-7.337	-476.1
polyrC-polyrC^+	-3775.0	-9.437 ± 0.005	-2656.0	-6.640	-1039.4
H_2O	-3269.6	-8.174 ± 0.005	-3269.6	-8.174	

$$U_{\text{ВВ}} [\text{polyrC-polyrC}^+] = -79.6 \text{ ккал/моль}$$

Изучение мгновенных конфигураций системы $\text{polyrC}+\text{H}_2\text{O}$ позволило определить наиболее предпочтительные места связывания молекул воды с односпиральной конформацией polyrC . С тетра nukлеотидом Н-связи образуют 40 молекул воды, в среднем по 10 молекулы воды на нуклеотид, что согласуется с экспериментальными данными [8,9]. Точки гидратации нуклеотидов в спирали совпали с точками гидратации изолированных нуклеотидов. Так, у остатков цитозина наиболее гидратирована группа $\text{C}_2=\text{O}$. На каждую фосфатную группу и рибозу приходится в среднем по 5-6 молекул воды (Рис.5).

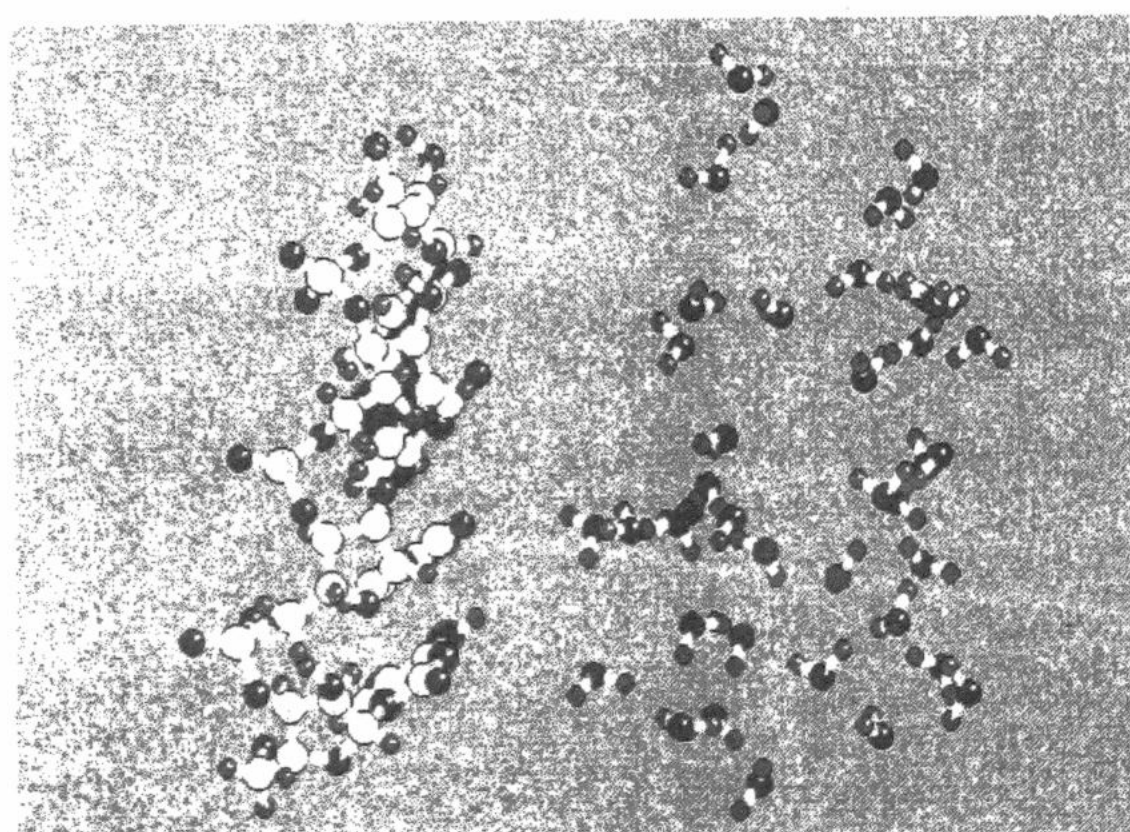


Рис.5. Фрагмент односпиральной polyrC и молекулы воды, образующие с ним Н-связи (молекулы воды смещены относительно polyrC).

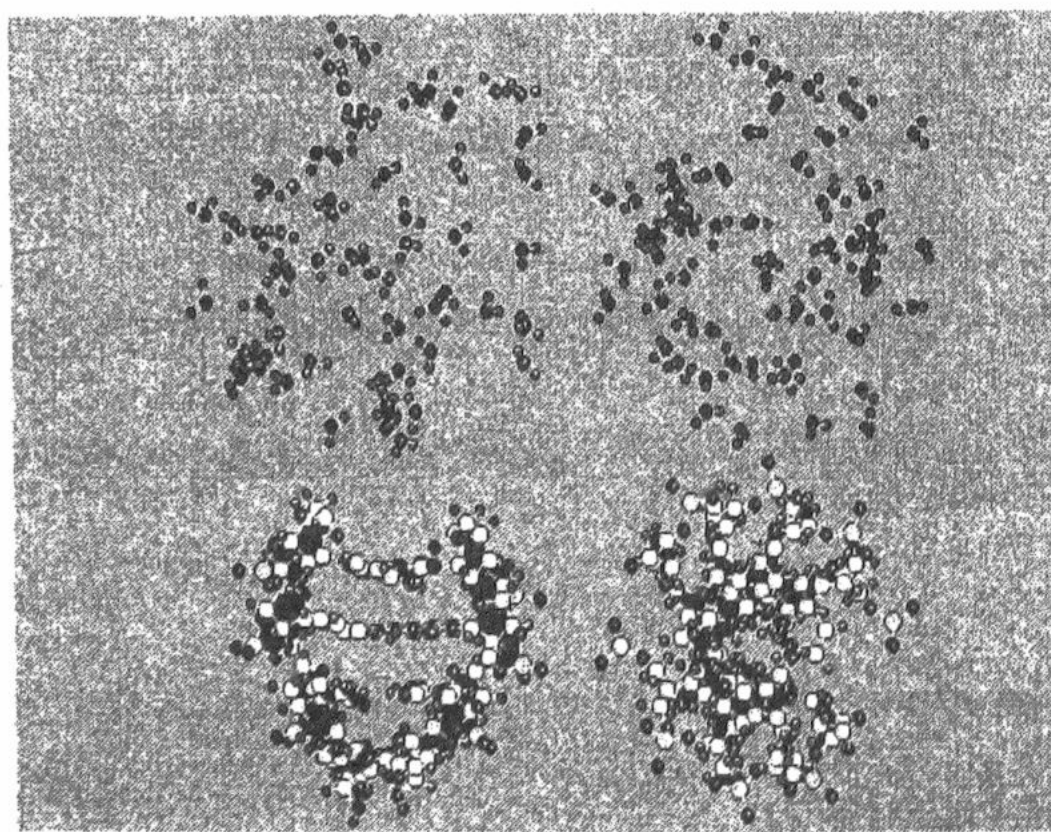


Рис 6. Фрагмент двухспиральной polyrC и молекулы воды, образующие с ним Н-связи; две проекции мгновенной конфигурации (молекулы воды смещены относительно polyrC-polyrC^+).

В рассматриваемой системе обнаружены 9 молекул воды, занимающих мостиковое положение между двумя гидрофильными центрами. В пределах одного и того же основания они связывают группы N3 и $\text{C}_2=\text{O}$ или N3 и N4H_2 группы. Внутри сахарофосфатного остова обнаружены молекулы воды, занимающие мостиковое положение между атомами $\text{O2}'$ и $\text{O5}'$, $\text{O5}'$ и $\text{O4}'$, а также между $\text{O3}'$ или $\text{O5}'$ и кислородами фосфатной группы. Обнаружены цепочки из двух молекул воды между группами $\text{C}_2=\text{O}$ и N3 соседних оснований. Особенностью системы $\text{polyrC}+\text{H}_2\text{O}$ является существование водных цепочек между группой $\text{C}_2=\text{O}$ и атомами $\text{O2}'$ и $\text{O4}'$ остова. Этот результат согласуется с предположениями, высказанными ранее в работах [3,5,6]. (Мостиком мы называем одну молекулу воды, расположенную между двумя

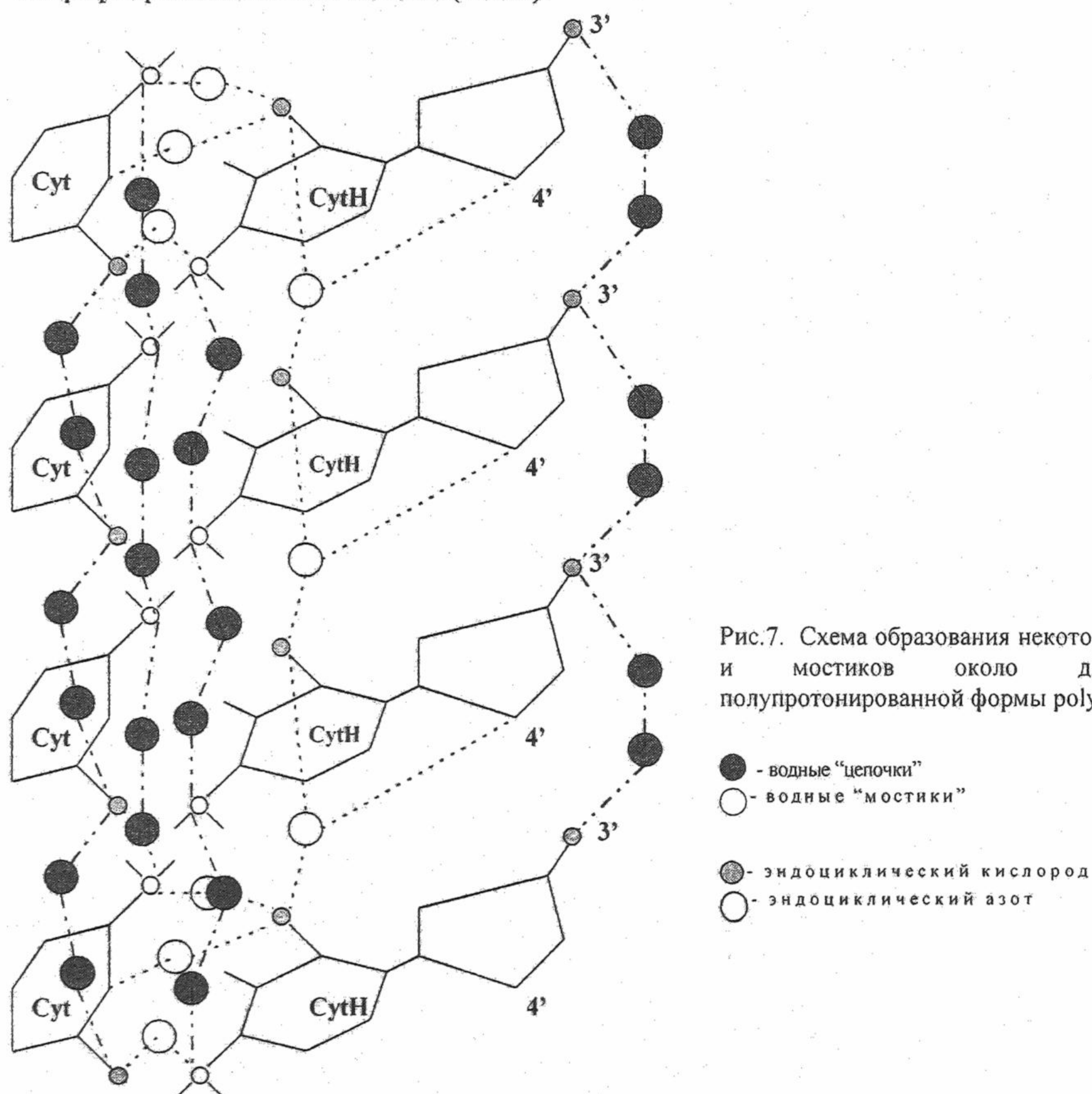
Изучение гидратации структурных форм полирибозитидиловой кислоты ...

гидратноактивными центрами, а цепочкой - две или более молекулы воды, связанные между собой и соединяющие два гидратноактивных центра).

Энергетические характеристики системы $\text{polyrC-polyrC}^+ + \text{H}_2\text{O}$ представлены в таблице 3. Стабильность этой системы определяется как взаимодействием между цепями в двойной спирали, которая составляет около -20 ккал/моль на пару оснований (-79.6 ккал/моль для дуплекса), так и взаимодействием с растворителем. Наибольший вклад во взаимодействие polyrC-polyrC^+ с водой вносят 65 молекул воды, из них с polyrC Н-связи образуют 30 молекул воды, а с polyrC^+ - 43; 8 молекул воды являются общими для двух цепей, образуя водные мостики и цепочки. Таким образом, на один нуклеотид приходится около 8 молекул воды, что согласуется с экспериментальными данными [8,9].

Сравнение величин U_{WW} и $U_{\text{WW}/1}$ двух систем - одно- и двухцепочечной polyrC (см. табл.3) - приводит нас к выводу о том, что в системе $\text{polyrC-polyrC}^+ + \text{H}_2\text{O}$ структура воды сильно разрушена. Очевидно, в этой системе существуют молекулы воды, которые связаны с гидрофильными участками двойной спирали, а между собой образуют не более 2 Н-связей, т.е. формируют неразветвленные водные цепочки. При этом молекулы воды как бы становятся частью структуры спирали. (Рис.6.).

Анализ мгновенных конфигураций системы $\text{polyrC-polyrC}^+ + \text{H}_2\text{O}$ позволил получить детальную картину локализации молекул воды вблизи двойной спирали. С каждой парой оснований Н-связи образуют 5-6 молекул воды. Наиболее гидратированы группы $\text{C}_2=\text{O}$, в меньшей степени - группы N_3 , N_3H , N_4H_2 и C_5H цитозинов. Схема гидратации сахарофосфатного остова двойной спирали аналогична схеме гидратации односпиральной формы. В системе $\text{polyrC-polyrC}^+ + \text{H}_2\text{O}$ обнаружены водные мостики, связывающие пары оснований противоположных цепей, пары оснований в стопке, а также основания с сахарофосфатным остовом их цепи (Рис.7.).



Между парами оснований образуются мостики, связывающие группы $\text{C}_2=\text{O}$ и N_4H_2 , $\text{C}_2=\text{O}$ и N_3 (N_3H) цитозинов противоположных цепей. Найдены молекулы воды, занимающие мостиковое положение между группами $\text{C}_2=\text{O}$ соседних протонированных оснований и атомами O_4' рибозы. В дуплексе тетрануклеотида выявлено четыре цепочки молекул воды. Эти цепочки соединяют гидрофильные группы оснований,

первая - группы N_4H_2 , а вторая - группы $C_2=O$. В протонированной спирали цепочки молекул воды образуются между группами N_4H_2 оснований и атомами O_3' и O_4' сахарофосфатного остова.

ВЫВОДЫ

Изучение взаимодействия структурных компонентов нейтральной и полупротонированной форм полирибозитидиловой кислоты с водным окружением, выполненное на молекулярном уровне с помощью метода Монте Карло, позволило нам сделать следующие выводы. По мере усложнения структурных элементов *polyrC* - от ассоциатов цитозина [2] до спиральных олигонуклеотидов - роль водных мостиков и цепочек в стабилизации упорядоченных структур возрастает. Уже на уровне стэкинг-димеров цитозинов, ВС-пар нейтральной и протонированной форм цитозинов и цитидиномонофосфатов, динуклеозидмонофосфатов обнаружены водные мостики, которые определяют энергетическую предпочтительность образования структур с параметрами, совпадающими с параметрами спиральных одно- и двухцепочечных *polyrC*. В более сложных элементах спирали - одноцепочечном тетрануклеотиде и дуплексе полупротонированного тетрануклеотида - образуются водные мостики и цепочки, связывающие пары оснований противоположащих цепей, пары оснований в стопке и пары оснований с сахарофосфатным остовом и являющиеся как бы элементами структуры спирали. Поэтому можно утверждать, что стабильность одинарной и двойной спиралей *polyrC* определяется формированием специфической структуры молекул воды вблизи *polyrC* в большей степени, чем взаимодействием между противоположными цепями или стэкингом оснований вдоль цепи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шестопалова А.В., Анищенко В.Д., Малеев В.Я. // Вісник ХДУ №450, Біофіз. вісник, 1999, №2, с.17-22.
2. Шестопалова А.В., Анищенко В.Д., Малеев В.Я. // Вісник ХДУ №466, Біофіз. вісник, 1999, №3, с.15-20.
3. Prescott B., Gamache R., Livramento J., Thomas G.J. // Biopolymers, 1974, v.13, N 10, p.1821-1845
4. Yang J.T., Samejima T. // Prog.Nucl.Acid Res.Mol.Biol., 1976, v.9, N 2, p.223-300.
5. Leslie A.G.W., Arnott S. // J.Mol.Biol., 1978, v.119, p.399-414.
6. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот // Москва, "Мир", 1987, 584с.
7. Langridge R.A., Rich A. // Nature, 1963, v.198, N , p.725-728.
8. Maleev V.Ya. et al // Spectroscopy of biological molecules: new directions, Abs.8th Eur.Conf., 29 Aug.-9 Sept. 1999, The Netherlands, p.227-228.
9. Kashpur V.A., Semenov M.A., Sagaidakova N.N. // Вісник ХДУ №466, Біофіз. вісник, 1999, №3, с.29-32.
10. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.N., Teller E. // J.Chem.Phys., 1953, v.21, p.1087-1092
11. Danilov V.I., Tolokh I.S. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1990, v.7, N. 5, p.1167-1183.
12. Danilov V.I. et al // J.Biomol.Struct.Dyn., 1997, v.15, N 1, p.69-80.
13. Danilov V.I. et al // J.Biomol.Struct.Dyn., 1999, v.16, p.1107-1117.
14. Chou C.H., Thomas G.J. // Biopolymers, 1977, v.16, N 4, p.765-789.
15. Poltev V.I. et al // J.Biomol.Struct.Dyn., 1998, v.16, N 2, p.289-300.
16. Журкин В.Б., Полтев В.И., Флорентьев В.Л. // Мол.биол., 1980, т.14, вып.5, с.1116-1130.
17. Poltev V.I., Groklina T.I., Malenkov G.G. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1984, v.2, N 3, p.413-429.
18. Dewar M.J.S., Zebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. // J.Am.Chem.Soc., 1985, v.107, N 13, p.3902-3909
19. Subramanian P.S., Beveridge D.L. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1989, v.6, N 6, p.1093-1122.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

КВАНТОМЕХАНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ
ПРОЛИНСОДЕРЖАЩЕГО ЦИКЛОДЕКАПЕПТИДА АНТАМАНИДА.

С.Г.Степаньян, О.В.Дурнева

Физико-технический институт низких температур НАН Украины

Харьков, пр. Ленина 47, 61164. E-mail: stepanian@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 8 июня 2000 года

Представлены результаты квантовомеханического исследования структуры пролинсодержащего пептида антаманида - cyclo (- Val₁ - Pro₂ - Pro₃ - Ala₄ - Phe₅ - Phe₆ - Pro₇ - Pro₈ - Phe₉ - Phe₁₀ -), а также его комплекса с 22 молекулами воды, моделирующими первую гидратную оболочку. Анализ структурных параметров пролиновых фрагментов, расположенных на участках β - изгибов изолированного и гидратированного антаманида, позволил установить, что фрагменты Pro₂ и Pro₇ антаманида являются структурными аналогами конформера пролина Ia, а фрагменты Pro₃ и Pro₈ являются структурными аналогами конформера пролина Pa. Это показывает, что при моделировании структуры пептидов методами молекулярной механики для различных фрагментов пролина на участках β - изгибов должны использоваться различные наборы параметров, соответствующие конформерам пролина Ia и Pa. Полная энергия межмолекулярных взаимодействий в гидратном комплексе антаманида составляет -142.3 ккал/моль, в том числе -110.7 ккал/моль приходится на взаимодействие антаманид-вода и -31.6 ккал/моль на взаимодействие вода-вода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антаманид, пролин, квантовомеханические расчеты, метод AM1, молекулярная структура, гидратация.

В последнее время с использованием низкотемпературной матричной ИК-спектроскопии и квантовомеханических расчетов впервые были получены данные о конформационной структуре изолированных аминокислот алифатического ряда [1-5]. Также были определены молекулярные параметры (геометрии, силовые постоянные) для различных конформеров аминокислот и было предложено использовать эти данные для параметризации методов молекулярного моделирования структуры биомолекул. Однако вопрос о соответствии данных, полученных для конформеров изолированных аминокислот, структуре аминокислотных фрагментов пептидов остается открытым. Главной задачей исследований, результаты которых представлены в данной работе, является установление степени соответствия структурных параметров изолированных конформеров пролина и структурных параметров пролиновых фрагментов в реальных пептидах. В качестве модельного пептида был выбран пролинсодержащий циклодекапептид антаманид - cyclo (- Val₁ - Pro₂ - Pro₃ - Ala₄ - Phe₅ - Phe₆ - Pro₇ - Pro₈ - Phe₉ - Phe₁₀ -) (Рис. 1). Биологические функции антаманида подробно рассмотрены в работах [6-8].

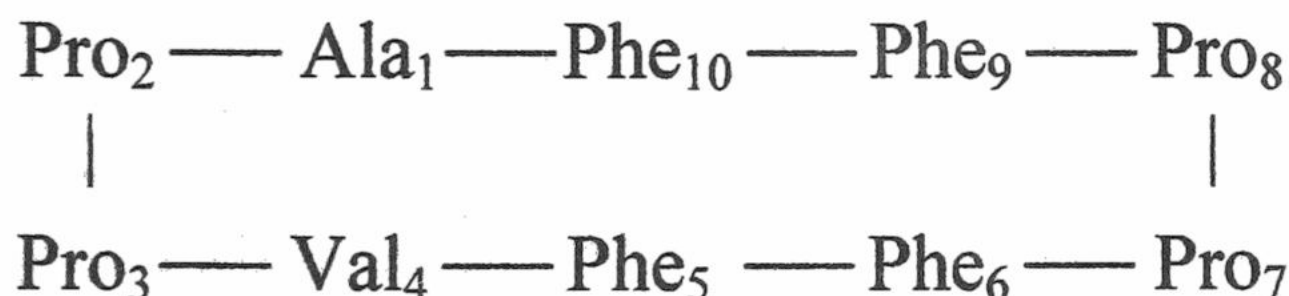


Рис. 1. Первичная структура циклодекапептида антаманида.

ДЕТАЛИ РАСЧЕТОВ

Как видно из Рис. 1, антаманид включает 4 пролиновых фрагмента, 4 фенилаланиновых фрагмента и по одному фрагменту валина и аланина. Общее число атомов - 162. Для установления влияния воды на структуру антаманида дополнительно были проведены расчеты комплекса антаманида с 22-мя молекулами воды, моделирующими первую гидратную оболочку. При этом гидратируются все протонодонорные и протоноакцепторные центры антаманида. Число атомов в комплексе антаманид-22H₂O составляет 228.

Поскольку размеры антаманида исключают использование неэмпирических методов для определения его структуры, оптимизация геометрии антаманида, а также его комплекса с 22 молекулами воды, выполнялась с помощью полуэмпирического квантовомеханического метода AM1 (Austin Model).

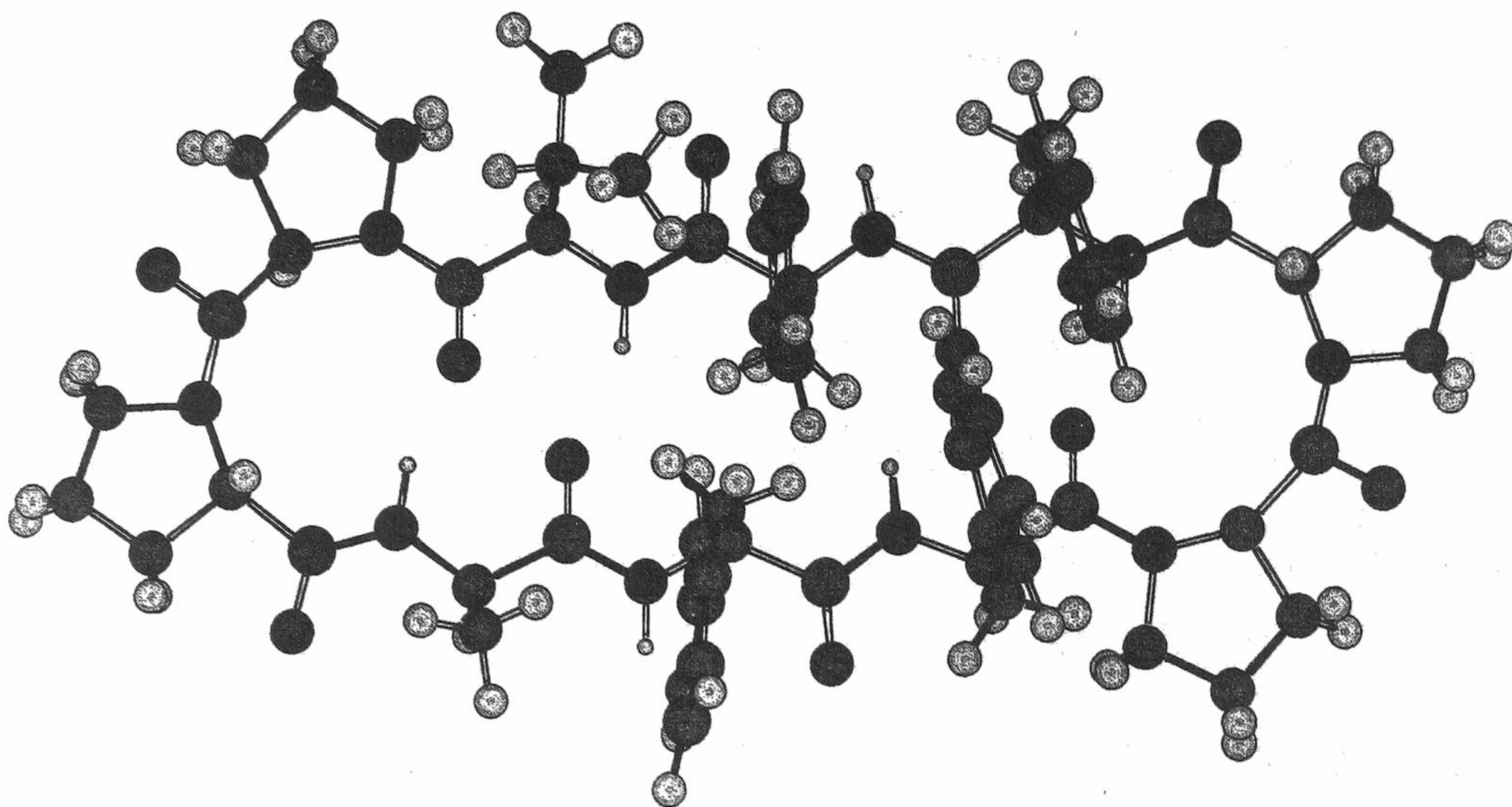


Рис. 2. Рассчитанная методом AM1 структура изолированного циклодекапептида антаманида.

Выбор метода AM1, основанного на приближении MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), определяется тем, что энергии образования и геометрии молекул, полученные этим методом, находятся в лучшем согласии с экспериментом по сравнению с данными других полуэмпирических методов, особенно в случае расчета молекул, содержащих гетероатомы [9]. Метод AM1 основан на приближении нулевого двухцентрового дифференциального перекрытия, которое приводит к значительному сокращению числа двухэлектронных интегралов и более простой вычислительной процедуре. Расчетная схема метода AM1 отличается от исходного метода MNDO способом вычисления энергии отталкивания остовов. Методический анализ приближений, положенных в основу расчетных схем, и способы выбора параметров рассмотрены в [9].

Метод AM1 дает результаты, не уступающие по точности данным неэмпирических расчетов в базисе 4-31G, причем затраты времени ЭВМ в 1000 раз меньше [9]. Последнее обстоятельство является решающим при выборе квантовомеханического метода расчета структуры антаманида. Расчеты методом AM1 проводились на компьютере PC Pentium II с использованием пакета программ GAMESS [10].

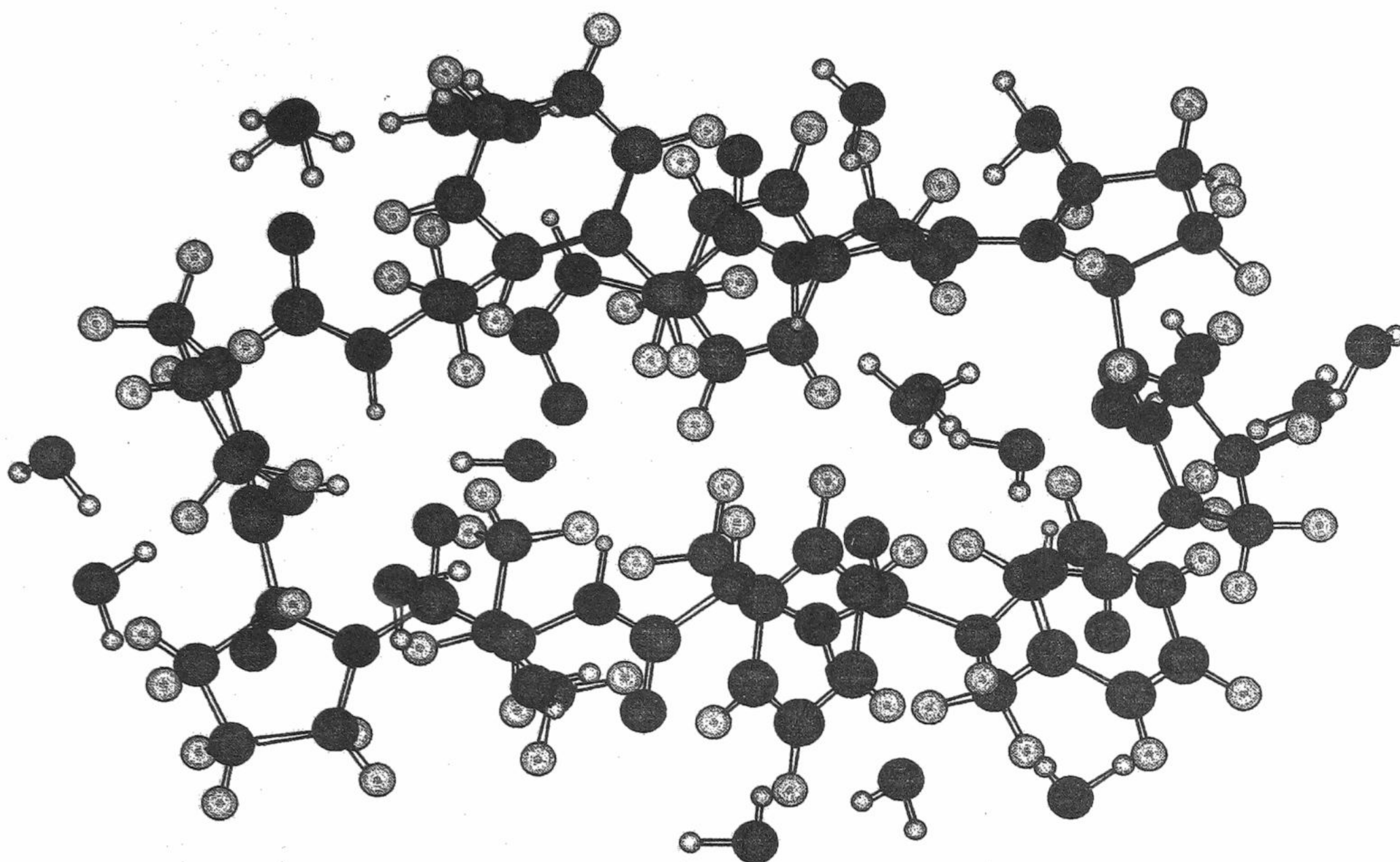
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассчитанная структура антаманида и гидратированного антаманида.

В результате полной оптимизации геометрии получены структурные параметры антаманида и комплекса антаманид·22H₂O. Рассчитанные структуры двух систем показаны на Рис. 2 и 3. Молекула антаманида как в изолированном, так и в гидратированном состоянии, может быть условно разделена на три фрагмента: два β-изгиба на участках Pro2-Pro3 и Pro7-Pro8, а также β-слой, состоящий из двух параллельных участков пептидной цепи с четырьмя межцепочечными водородными связями N-H...O. Особенностью аминокислотного состава антаманида является отсутствие боковых радикалов с полярными (гидрофильными) группами. Как видно из Рис. 3, в антаманиде Н-связывание может происходить только при взаимодействии с атомами собственно пептидной цепи. В результате расчетов гидратного комплекса получено следующее распределение молекул воды в первой гидратной оболочке:

- 12 молекул воды связываются с 6-ю атомами кислорода пептидных связей, экспонированных наружу макроцикла, при этом с каждым атомом кислорода взаимодействуют по две молекулы воды, образуя три водородные связи: две вода-антаманид плюс дополнительная мостиковая Н-связь между молекулами воды;
- 2 молекулы воды связываются с двумя N-H атомами пептидных групп, экспонированных наружу макроцикла, с образованием водородных связей N-H...O;
- оставшиеся 8 молекул воды связываются с атомами азота четырех пролиновых фрагментов (по две молекулы воды на фрагмент).

Рассчитанные значения энергий комплекса антаманид·22H₂O, а также мономерных молекул (антаманида и воды) позволяет определить энергию межмолекулярных взаимодействий. Полная энергия

Рис. 3. Рассчитанная методом AM1 структура комплекса антаманид+22 H₂O.

межмолекулярных взаимодействий составляет -142.3 ккал/моль, в том числе -110.7 ккал/моль приходится на взаимодействие антаманид-вода и -31.6 ккал/моль на взаимодействие вода-вода.

Сравнение структур антаманида в изолированном и гидратированном состояниях показывает, что связывание молекул воды не приводит к существенному изменению макроструктуры антаманида и проявляется в основном в изменении геометрий локальных фрагментов, участвующих в образовании межмолекулярных Н-связей. Общей закономерностью является увеличение длин связей, образуемых гидратируемыми атомами. Кроме этого можно также отметить незначительное (в пределах 10°) изменение ориентаций фенилаланиновых групп.

Особый интерес представляет анализ структуры пролиновых фрагментов изолированного и гидратированного антаманида и ее сравнение со структурой изолированных конформеров пролина. Результаты этого анализа приведены в следующем разделе.

Структура пролиновых фрагментов антаманида.

Как уже отмечалось выше, в составе антаманида присутствуют четыре пролиновых фрагмента, обозначенных как Pro2, Pro3, Pro7 и Pro8 (Рис. 1). Геометрические параметры этих конформеров, полученные для изолированного и гидратированного антаманида, приведены в Таблицах 1 и 2, соответственно. Нумерация атомов пролинового фрагмента антаманида приведена на Рис. 4.

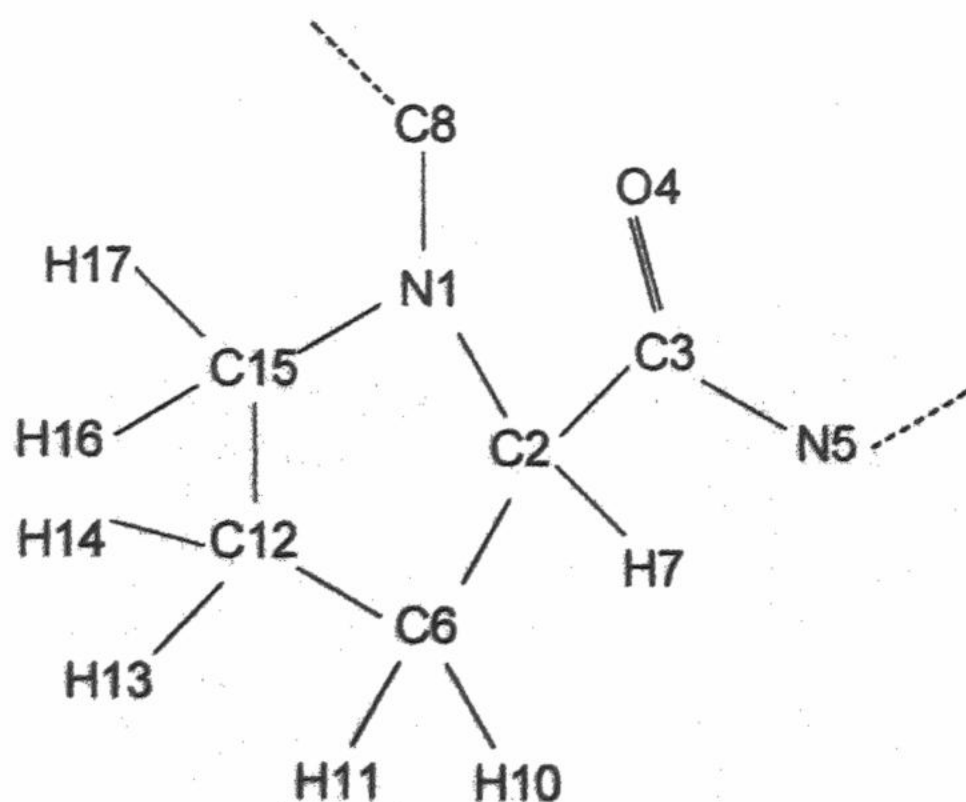


Рис.4. Нумерация атомов пролинового фрагмента.

Таблица 1. Структурные параметры пролиновых фрагментов изолированного антаманида

	Pro2	Pro3	Pro7	Pro8
Связи, ангстремы				
1-2	1.459	1.457	1.456	1.457
2-3	1.544	1.547	1.548	1.548
3-4	1.248	1.250	1.249	1.248
3-5	1.380	1.373	1.379	1.376
2-6	1.544	1.546	1.545	1.545
2-7	1.129	1.131	1.129	1.131
1-8	1.383	1.380	1.392	1.379
6-10	1.117	1.119	1.117	1.119
6-11	1.119	1.118	1.117	1.118
6-12	1.525	1.524	1.526	1.525
12-13	1.117	1.118	1.117	1.118
12-14	1.117	1.117	1.117	1.117
12-15	1.538	1.538	1.539	1.538
15-16	1.126	1.125	1.125	1.126
15-17	1.125	1.125	1.126	1.125
Валентные углы, градусы				
1-2-3	112.7	114.8	112.3	112.4
2-3-4	121.0	119.7	121.6	121.2
2-3-5	118.9	118.8	118.3	117.2
1-2-6	107.3	106.5	107.2	106.7
1-2-7	106.7	109.4	107.5	109.6
2-1-8	120.6	121.8	119.7	122.0
2-6-10	109.9	110.9	109.6	110.9
2-6-11	110.4	109.2	110.7	109.2
2-6-12	106.2	106.4	106.3	106.5
6-12-13	110.9	110.8	110.8	110.8
6-12-14	111.0	111.2	111.0	111.1
6-12-15	106.6	106.4	106.6	106.5
12-15-16	110.8	110.7	111.0	110.7
12-15-17	110.3	110.5	110.1	110.9
Торсионные углы, градусы				
1-2-3-4	47.9	-142.7	33.1	-118.1
1-2-3-5	-130.4	41.1	-144.7	63.3
4-3-2-6	158.4	151.8	168.1	151.6
4-3-2-7	-83.3	32.0	-72.1	31.9
3-2-1-8	37.5	-85.9	48.0	-86.7
3-2-6-10	128.3	133.7	115.5	130.7
3-2-6-11	-112.2	-107.4	-125.3	-110.2
3-2-6-12	7.7	12.3	-4.6	9.7
2-6-12-13	111.8	111.2	119.4	114.8
2-6-12-14	-128.1	-128.6	-120.5	-125.1
2-6-12-15	-8.0	-8.4	-0.6	-4.9
6-12-15-16	124.5	120.9	124.1	117.6
6-12-15-17	-115.9	-119.1	-116.5	-122.2

Анализ этих данных и их сравнение со структурными параметрами конформеров пролина Ia и IIa (Рис. 5) позволяет сделать следующие выводы:

- Все пролиновые фрагменты, как в изолированном, так и в гидратированном антаманиде, имеют близкие значения длин связей и валентных углов. Разница достигает 0.01 Å для длин связей и 1° для валентных углов. В то же время наблюдаются значительные отличия торсионных параметров пролиновых фрагментов, особенно для включенных в пептидную цепь участков.
- Как видно из Таблицы 1, пролиновые фрагменты изолированного антаманида могут быть разделены на две группы в зависимости от значений их торсионных параметров. К первой группе относятся Pro2 и Pro7. Величины их торсионных углов 1-2-3-4 составляют 47.9° и 31.1°, соответственно. Ко второй группе могут быть отнесены Pro3 и Pro8, для которых величины торсионных углов 1-2-3-4

Квантовомеханическое исследование структуры циклодекапептида ...

Таблица 2. Структурные параметры пролиновых фрагментов гидратированного антаманида

	Pro2	Pro3	Pro7	Pro8
Связи, ангстремы				
1-2	1.461	1.457	1.459	1.461
2-3	1.544	1.544	1.548	1.546
3-4	1.258	1.260	1.256	1.249
3-5	1.372	1.366	1.381	1.377
2-6	1.545	1.547	1.547	1.546
2-7	1.133	1.135	1.133	1.133
1-8	1.374	1.372	1.385	1.381
6-10	1.117	1.118	1.118	1.118
6-11	1.122	1.118	1.123	1.119
6-12	1.526	1.524	1.524	1.523
12-13	1.116	1.118	1.117	1.120
12-14	1.120	1.118	1.118	1.117
12-15	1.538	1.536	1.538	1.535
15-16	1.125	1.128	1.124	1.127
15-17	1.126	1.124	1.127	1.128
Валентные углы, градусы				
1-2-3	112.1	114.9	111.7	113.4
2-3-4	120.5	119.0	122.1	121.4
2-3-5	119.5	120.1	118.4	117.2
1-2-6	107.2	106.4	107.7	107.0
1-2-7	106.7	109.6	108.8	109.6
2-1-8	121.0	122.3	120.2	121.4
2-6-10	109.8	111.4	109.6	111.2
2-6-11	110.6	108.6	111.0	109.0
2-6-12	106.4	106.3	106.2	106.2
6-12-13	111.3	111.0	111.0	110.8
6-12-14	110.3	111.1	111.0	111.4
6-12-15	106.9	106.2	106.5	106.1
12-15-16	110.9	111.5	111.3	110.7
12-15-17	110.1	110.3	109.3	110.0
Торсионные углы, градусы				
1-2-3-4	49.3	-150.9	32.9	-119.6
1-2-3-5	-129.0	33.1	-147.0	62.0
4-3-2-6	161.9	154.5	-153.1	147.6
4-3-2-7	-79.2	35.1	-33.0	28.5
3-2-1-8	41.6	-83.2	88.7	-90.0
3-2-6-10	125.6	135.9	120.8	133.8
3-2-6-11	-114.5	-105.3	-120.5	-106.8
3-2-6-12	5.0	14.0	0.3	12.6
2-6-12-13	118.7	106.8	114.7	104.6
2-6-12-14	-120.9	-133.0	-125.2	-134.3
2-6-12-15	-1.9	-12.8	-5.4	-14.1
6-12-15-16	117.2	126.9	130.1	129.4
6-12-15-17	-122.7	-112.7	-109.8	-109.3

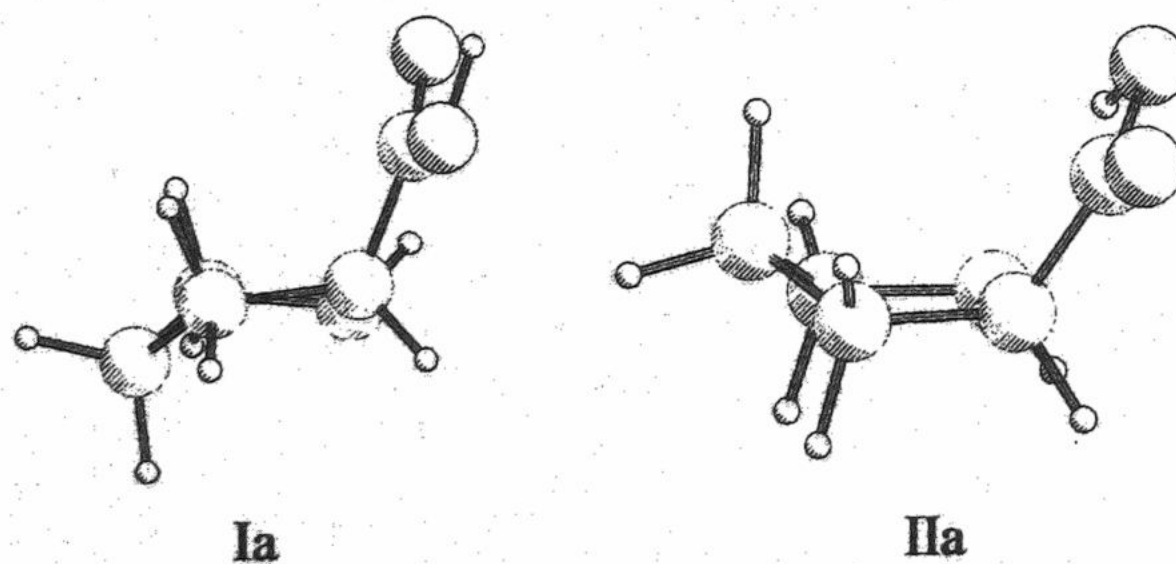


Рис. 5. Структура наиболее стабильных конформеров пролина.

Таблица 3. Торсионные параметры наиболее стабильных конформеров пролина Ia и IIa, рассчитанные методами MP2/aug-cc-pVDZ и DFT/B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Параметр	пролин Ia		пролин IIa	
	MP2	DFT	MP2	DFT
N1-C2-C3-O4	5.0	6.1	-182.3	-179.9
N1-C2-C3-O5	-174.9	-173.3	-2.0	-0.0
O4-C3-C2-C6	-112.4	-113.3	61.6	62.8
O4-C3-C2-H7	126.8	127.0	-60.8	-58.6
C3-C2-N1-H8	26.0	13.0	120.3	112.2
C2-C3-O5-H9	-179.7	-180.2	-0.1	0.6
C3-C2-C6-H10	5.1	19.6	-31.6	-25.0
C3-C2-C6-H11	-114.1	-100.0	-152.4	-144.6
C3-C2-C6-C12	1.4	13.8	91.0	98.1
C2-C6-C12-H13	88.9	84.1	162.4	157.9
C2-C6-C12-H14	-149.1	-154.6	284.3	279.0
C2-C6-C12-C15	-27.4	-33.0	41.3	36.6
C6-C12-C16-H16	161.6	159.2	78.9	81.6
C6-C12-C16-H17	-76.1	-80.0	200.7	202.8

составляют -142.7° и -118.1° . Аналогичные отличия наблюдаются также для торсионных углов 1-2-3-5: -130.4° , -144.7° (Pro2 и Pro7) и 41.1° , 63.3° (Pro3 и Pro8); для торсионных углов 4-3-2-7: -83.3° , -72.1° (Pro2 и Pro7) и 32.0° , 31.9° (Pro3 и Pro8).

- Сравнение торсионных параметров пролиновых фрагментов антаманида (Табл. 1) и конформеров пролина (Табл. 3) показывает, что фрагменты Pro2 и Pro7 являются структурными аналогами конформера пролина Ia, а фрагменты Pro3 и Pro8 являются структурными аналогами конформера пролина IIa. Это показывает, что при моделировании структуры пептидов методами молекулярной механики для различных фрагментов пролина на участках β -изгибов должны использоваться различные наборы параметров, соответствующие конформерам пролина Ia и IIa.
- При гидратации антаманида структура его пролиновых фрагментов претерпевает определённые изменения, наиболее существенные для торсионных параметров. Изменения длин связей и валентных углов не превышают $0.01 \text{ \AA}$ и 1.5° . В то же время изменения торсионных углов достигают 10° . Однако при этом полностью сохраняется структурное подобие фрагментов Pro2, Pro7 и Pro3, Pro8. Таким образом, выводы сделанные в предыдущем пункте являются правомерными и для гидратированных пептидов.

Авторы благодарят научный фонд NATO (Грант CRG.CRG973389) за финансовую поддержку исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reva I. D., Plokhotnichenko A. M., Stepanian S. G. et al. // Chem. Phys. Lett. 1995. V. 232. P. 141.
2. Stepanian S. G., Reva I. D., Radchenko E. D. et al. // J. Phys. Chem. A. 1998. V. 102. P. 1041.
3. Stepanian S. G., Reva I. D., Radchenko E. D., Adamovicz L. // J. Phys. Chem. A. 1998. V. 102. P. 4623.
4. Stepanian S. G., Reva I. D., Radchenko E. D., Adamovicz L. // J. Phys. Chem. A. 1999. V. 103. P. 4404.
5. Reva I.D., Stepanian S.G., Plokhotnichenko A.M. et al // J. Mol. Struct. 1994. V. 318. P.1.
6. Kessler H., Griesinger C., Lautz J. et al. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 3393.
7. Kessler H., Muller A., Pook K.-H. // Liebigs Ann. 1989. P. 903.
8. Kessler H., Bats J.W., Lautz J., Muller A. // Liebigs Ann. 1989. P. 913.
9. Dewar M.J.S., Zoebish E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. // J. Am. Chem. Soc. 1985. V. 107, N 13. P. 3902.
10. Schmidt M. W., Baldridge K. K., Boatz J. A. et al. // J. Comput. Chem. 1993. V. 14. P. 1347.

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

STUDY OF Cu^{2+} IONS EFFECT ON POLY(I) CONFORMATION IN SOLUTION BY VISCOMETRY AND IR SPECTROSCOPY METHODS.

D. N. Grigoriev, G. Zhuchkova, V. Andrushchenko, S. V. Kornilova, Yu. P. Blagoi.

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine.

47 Lenin Ave., 310164, Kharkov, Ukraine

Received November 14, 1999

The present work is aimed at studies on the Cu^{2+} interaction with poly(I) in solution by viscometry, UV and IR spectroscopy methods. Dependences of the intrinsic viscosity $[\eta]$ and helicity degree Θ of poly(I) on Cu^{2+} contents and IR spectra of poly(I) complexes with Cu^{2+} in solution were obtained. The data obtained permitted to calculate the binding degree (C) and association constants (K) of Cu^{2+} ions interacting with bases of single-stranded poly(I). It is shown that at small concentrations (lower than 10^{-5} M) the Cu^{2+} ions bind to the phosphate groups of poly(I). At the Cu^{2+} concentration above 10^{-5} M, the interaction between the metal ions and the poly(I) bases, especially with $\text{C}_6=\text{O}$ of inosine, occurs. This binding causes destabilization of the polymer and the helicity degree decrease down to the transition into the coil conformation. The Cu^{2+} binding to poly(I) in the coiled conformation induces the formation of intermolecular bonds, that has an effect on the sharp increase of $[\eta]$ as well as on the great increase of the absorption band intensity $\text{C}_6=\text{O}$. The larger concentration of the Cu^{2+} leads to the polymer aggregation.

KEY WORDS: Polyinosinic acid, Cu^{2+} , intrinsic viscosity, IR spectroscopy, helicity degree, binding degree

Polyinosinic acid (poly(I)) is one from the class of synthetic polynucleotides which have the same ribose-phosphate backbone as is found in a naturally occurring ribonucleic acid. Although inosinic acid is not found in naturally occurring nucleic acids, it is an important metabolic intermediate in the pathway of purine biosynthesis. However, the hypoxanthine base of inosinic acid is closely related to guanine, i.e. it is deaminated guanine. Thus, poly(I) is a biopolymer that is of interest for its biological activity as well as for fundamental studies. As is well known, the secondary and tertiary structures of poly(I) are strongly influenced by the solvent, intramolecular and intermolecular interactions [1-10]. In this connection bivalent metal ions (Me^{2+}) interactions with poly(I) is of interest for studies. Furthermore, the similar investigation is important because pollution of the environment with Me^{2+} is one of the central ecological problems. In spite of the great number of works [10 – 15] devoted to the Me^{2+} binding to poly(I), some questions remain unclear. This concerns, in particular, the Cu^{2+} interaction with poly(I). So, the question on the possibility of the Cu^{2+} binding to O(6) of hypoxanthine of inosinic acid in aqueous medium remains unsolved (remains to be answered) [10]. As well, the problem of changes in the biopolymer tertiary structure on its interaction with Cu^{2+} is poorly covered. Besides, the most of works investigate the Cu^{2+} interaction at low ionic strengths ($\sim 10^{-3}$ M Na) [11-13]. So, the present work is aimed at studies on the Cu^{2+} interaction with poly(I) in solution under conditions close to physiological ones (0.1 M Na^+ , pH=6), in the wide range of the ion concentrations (10^{-6} - 10^{-3} M). Besides, methods of viscometry, UV and IR spectroscopy used in the present work permitted to follow changes both in secondary and tertiary structures of the biopolymer.

MATERIALS AND METHODS

The potassium salt of polyriboinosinic acid (poly(I)) (NIKTI BAV, Russia) and CuCl_2 ("Reahim", USSR) were used. The molecular weight of poly(I) was determined by the Mark-Houwink equation with coefficients $k=3.3 \cdot 10^{-5}$; $a=0.9$ [3] and was equal to $1.1 \cdot 10^4$ Da. CuCl_2 was solved in acetate buffer (NaAc) (10^{-3} M Na^+ , pH6). The metal ions concentration was determined by weight and was controlled by complexometric method. The determination error of $[\text{Cu}^{2+}]$ didn't exceed 0.1 %. The solution of poly(I) was prepared in 0.1 M NaAc buffer, pH6. The sample was then heated at 65 °C for 5 min, to eliminate aggregation, and cooled quickly on ice. The phosphates concentration of single-stranded poly(I) was determined by measuring the absorbance at 250 nm, with Spectromom 202 spectrophotometer (MOM, Budapest, Hungary). The molar coefficient of extinction was $10800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [9].

Intrinsic viscosity measurements were made using the low gradient rotational Zimm-Crothers viscometer [16]. Relative viscosities [16] were determined at 20 °C in the concentration (c) range from 2.6 mg/ml to 5 mg/ml. The intrinsic viscosity $[\eta]$ was then determined by using:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{rel}} - 1}{c} \quad (1).$$

The infrared spectra of poly(I) complexes with Cu^{2+} in solution were obtained with IR spectrophotometer UR-20 (Carl Zeiss, Jena, Germany) in the regions of 1000-1350 and 1400-1800 cm^{-1} for H_2O and D_2O solutions, respectively. The specially designed CaF_2 cuvettes with path lengths of 63.8 μm were used [17]. The IR spectra were recorded at 29°C. The concentrations of poly(I) were 10.8 mg/ml and 14.6 mg/ml for H_2O and D_2O solutions, respectively.

The helicity degree (Θ) of poly(I) and binding degree (C) of Cu^{2+} interacting with bases of poly(I) were calculated by measuring the absorbance of poly(I) complexes with Cu^{2+} in solution at $\lambda_c = 253.2$ nm and $\lambda_b = 266$ nm, respectively, with Spectromom 202 spectrophotometer (MOM, Budapest, Hungary). The calculations were made as is described in [10]. The concentration of poly(I) was 15.6 $\mu\text{g/ml}$.

RESULTS AND DISCUSSIONS

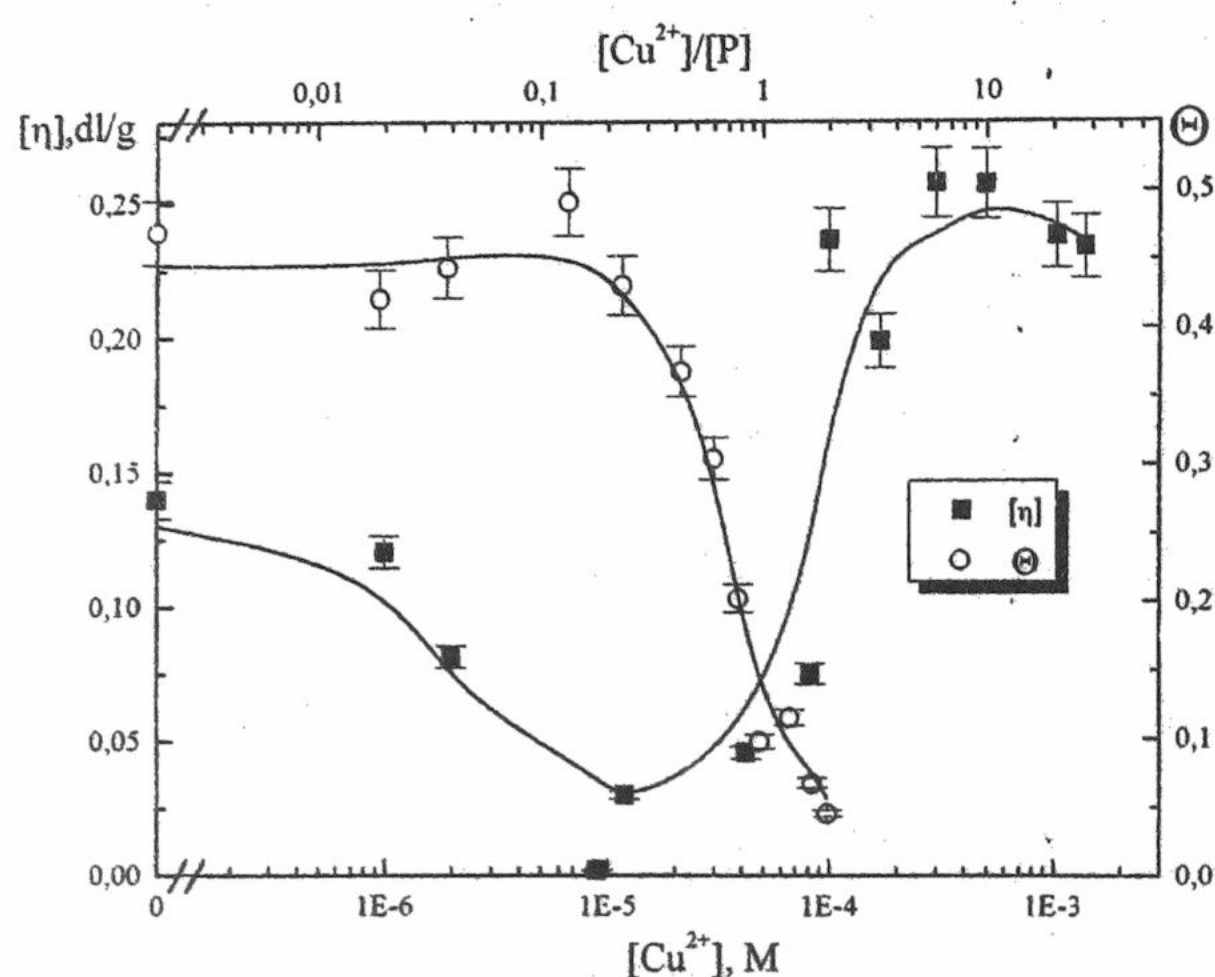


Fig. 1 Dependence of changes in single-stranded poly (I) helicity degree (Θ) and intrinsic viscosity $[\eta]$ on concentrations of Cu^{2+} .

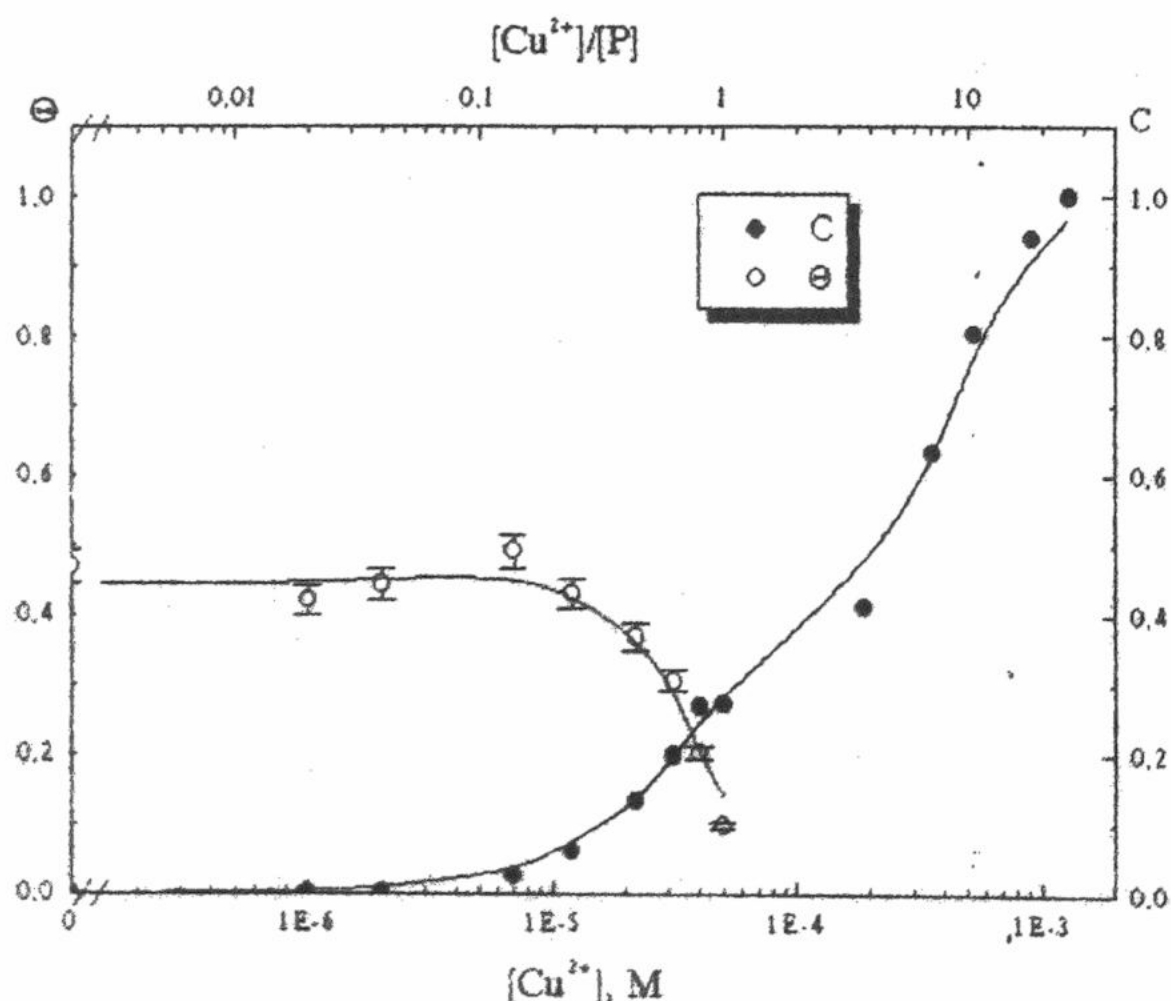


Fig. 2 Dependence of changes in single-stranded poly (I) helicity degree (Θ) and binding degree (C) on concentrations of Cu^{2+} .

As a number of works show [3-9], poly (I) at 0.1M Na^+ is in a single-chain conformation being the equilibrium between the coiled nonordered and ordered helical states [10]. As can be seen (Fig. 1), in the absence of copper ions the helicity degree of poly (I) is 0.47.

The dependence of the intrinsic viscosity $[\eta]$ of poly (I) on Cu^{2+} contents is shown in Fig. 1

In the concentration range up to 10^{-5} M Cu^{2+} ions induce the essential decrease (~ 9 times) of the polymer $[\eta]$. Perhaps, this is connected with the decrease of the macromolecule excluded volume due to the Cu^{2+} ion binding to phosphates of poly (I) because in this concentrational range no metal ion binding to hypoxanthine is practically present (Fig. 2).

The further increase of Cu^{2+} contents from 10^{-5} M up to 10^{-4} M leads to the increment of the poly(I) intrinsic viscosity and induces its sharp increase in the narrow range ($10^{-4} - 2 \cdot 10^{-4}$ M Cu^{2+}) of concentrations. The rise of the Cu^{2+} concentration up to 10^{-3} M induces aggregation of poly (I) and the further precipitation of aggregates.

Also it is shown that in the concentration range up to 10^{-5} M Cu^{2+} ions induce no essential changes in the helicity degree Θ (Fig 1), and the binding degree C of Cu^{2+} interacting with bases of poly(I) (fig. 2) is small. The increase of C and sharp decrease of the Θ are observed at Cu^{2+} concentration from 10^{-5} M to 10^{-4} M. The increase of cuprum ions contents (up to 10^{-3} M) doesn't change the helicity degree and causes the further rise of the binding degree up to 1.

Study of Cu^{2+} ions effect on poly(I) conformation in solution ...

The data obtained permitted to calculate the association constant (K) [10] of Cu^{2+} ions interacting with bases of single-stranded poly I (fig. 3).

$$C/([Me]-Cn[P])=K(1-C) \quad (2)$$

$$[Mt]=C_f + [P] \cdot Cn \quad (3)$$

where C is the binding degree of a ligand interacting with poly(I); $[Me]$ is the total ligand concentration in solution; $[P]$ is the poly(I) concentration in phosphorum moles; n is the number of ligand binding sites; C_f is the concentration of free divalent metal ions in solution.

$$K=K_0 e^{-\omega C} \quad (4)$$

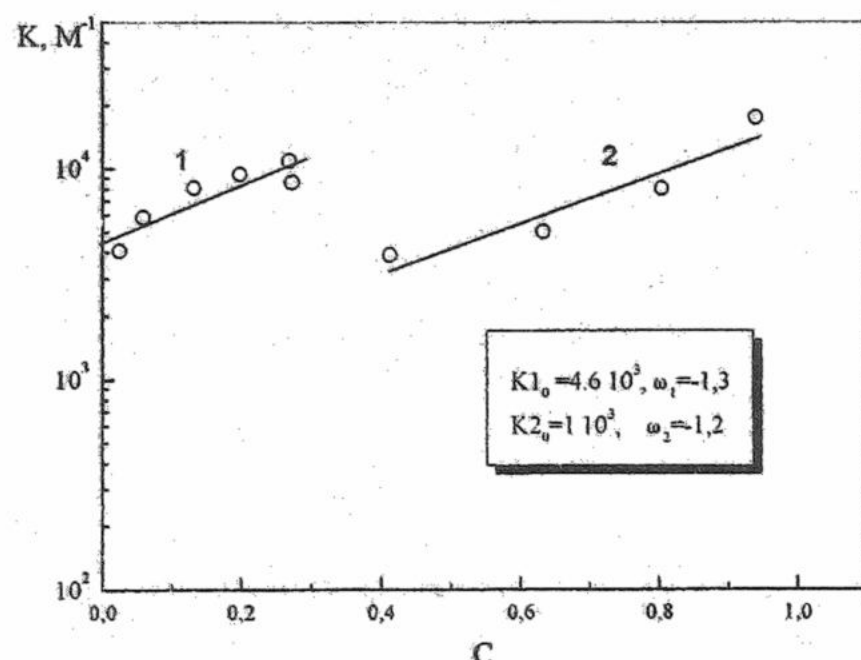


Fig. 3. Dependence of changes in association constants of Cu^{2+} ions interacting with bases of single-stranded poly (I) on binding degree (C). 1 - helical conformation; 2- coiled conformation.

The determination error of association constants was about 30%.

due to the formation of intramolecular loops in coils and intermolecular links is observed.

Values of binding constants obtained are in an qualitative agreement with $K=1,6 \times 10^4$ from [10]. The quantitative difference is due to a difference in Na^+ concentrations - 10^{-3}M [10] and 0.1M .

Also the IR spectra of poly(I) complexes with Cu^{2+} in solution were obtained. The IR spectra of single-stranded poly (I) complexes with Cu^{2+} ions in D_2O and H_2O solutions are presented Figs 4 and 5, respectively.

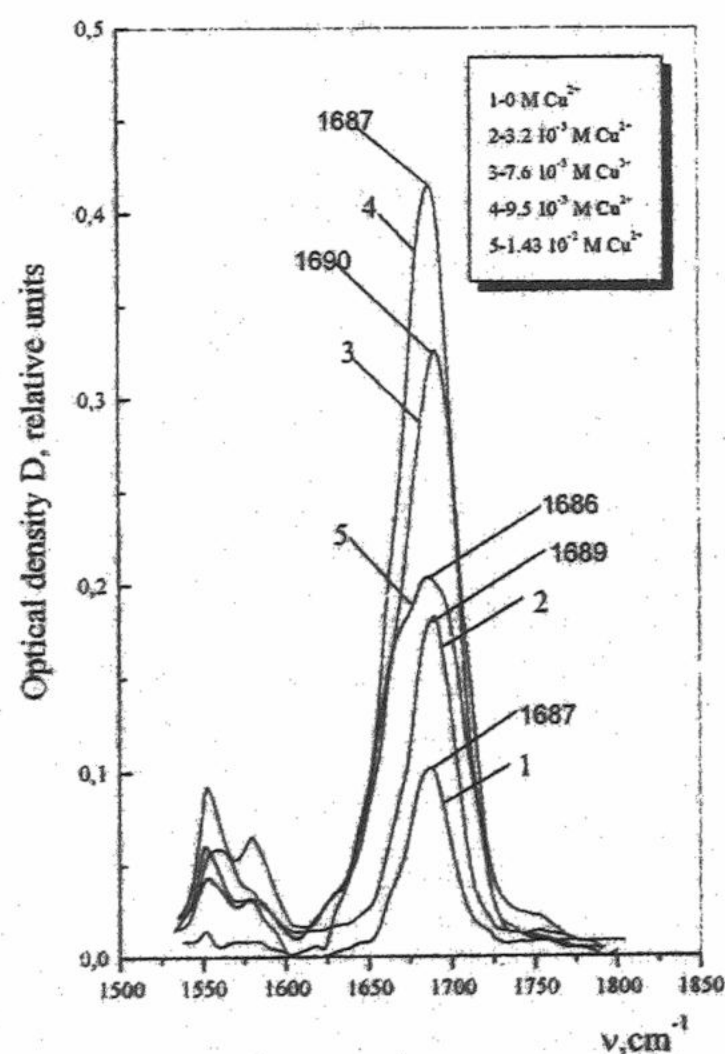


Fig. 4. - IR spectra of single-stranded poly (I) complexes with Cu^{2+} ions in D_2O solutions.

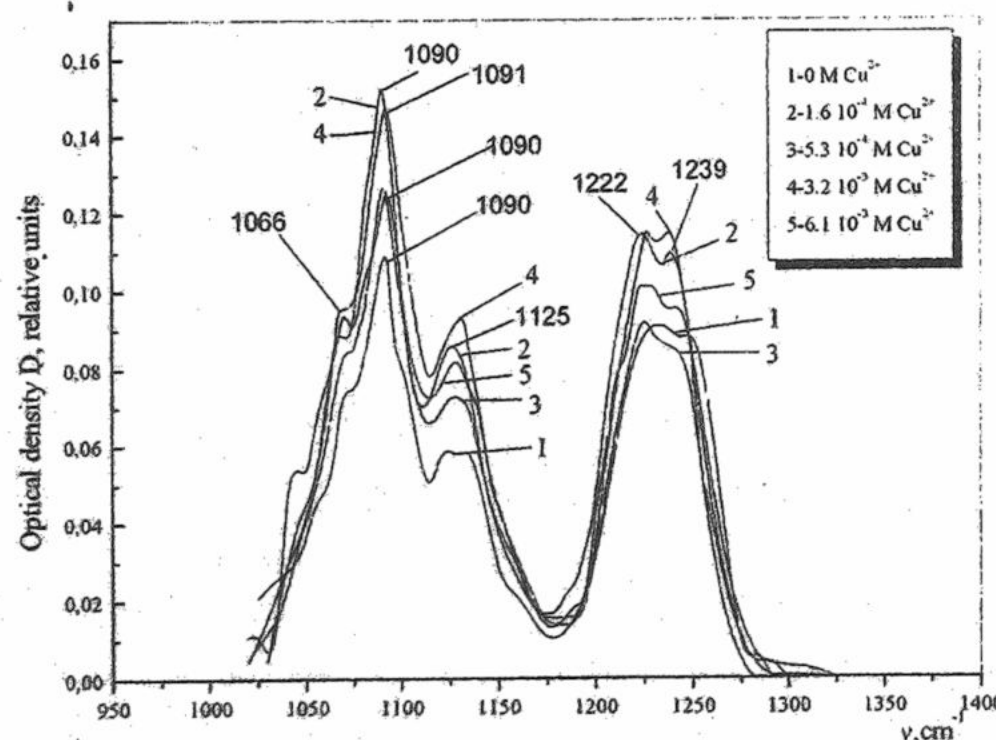


Fig. 5. - IR spectra of single-stranded poly (I) complexes with Cu^{2+} ions in H_2O solutions.

As it can be seen, the interaction of the cuprum ions with poly(I) doesn't lead to the significant shift of the characteristic absorption bands of symmetric (1090 cm^{-1}) and antisymmetric (1225 cm^{-1}) stretching vibrations of the phosphate groups [18] as well as of the absorption band of the vibrations $C_6=O$ of inosine (1687 cm^{-1}) [4-6], however changes their intensity. So, a small increase (~ 1.2 time) of the intensity of the absorption band of the symmetric stretching vibration of the phosphate groups (fig. 6) and the significant increase (for $[Cu^{2+}] / [P] = 0.2$) of the absorption band of the vibrations $C_6=O$ of inosine are observed. Such changes can be caused by the interaction of metal ions with phosphate groups and $C_6=O$ of the poly(I).

As was mentioned above, IR spectra were registered at 29°C . This temperature is a temperature of the single-chain poly (I) transition into the coiled state (Fig 7). Taking this into account as well as the fact that Cu^{2+} ions lower the melting temperature of polynucleotides [10], a conclusion may be derived that changes indicated in IR spectra resulted from the Cu^{2+} binding to poly (I) in the coiled conformation.

The anomalously large increase of the absorption band at 1687 cm^{-1} can be connected [19] with the formation of the intramolecular bonds that can lead to the formation of compact particles [10]. It is known that at the height Cu^{2+} content ($[Cu^{2+}] > 10^{-3}\text{ M}$ that corresponds to $[Cu^{2+}]/p > 0.1$ on the Fig.6) the aggregation of the disordered coiled polyI molecules appears, that can result in the decrease of the IR spectrum intensity..

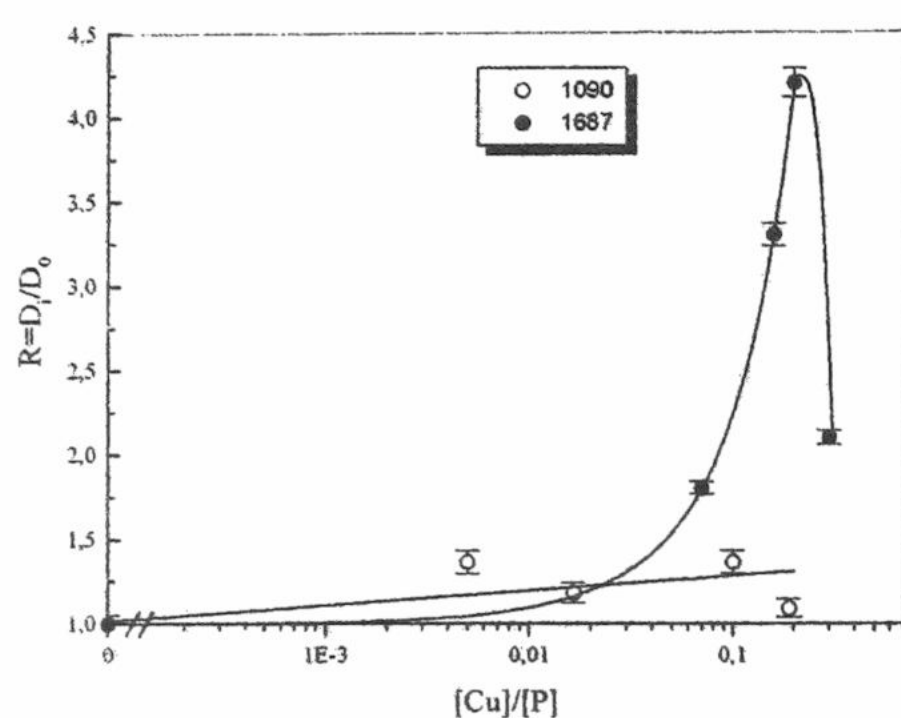


Fig. 6. Dependence of relative change in optical density of $[Cu^{2+}]/[P]$ for absorption band 1687 cm^{-1} (vibrations $C_6=O$ of inosine [4-6]) and absorption band 1090 cm^{-1} (symmetric stretching vibration of the phosphate groups [18]).

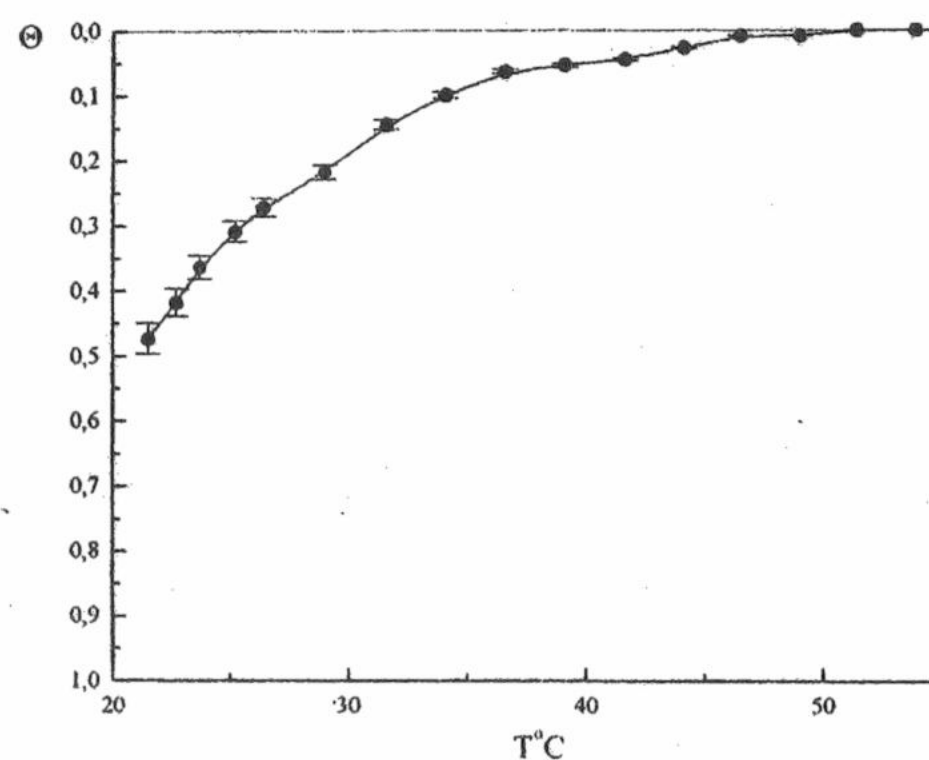


Fig. 7. The dependence of poly(I) helicity degree on temperature

CONCLUSION

Thus, the data obtained permitted to deduce the following conclusions:

At small concentrations (lower than 10^{-5} M) the Cu^{2+} ions bind with the phosphate groups of poly(I). At that the screening of the phosphate groups uncompensated negative charges takes place. This lowers the repulsion between the similar charge groups and, as a result, decreases the polymer root-mean-square size and intrinsic viscosity. Also, the same binding leads to the small increase of the polynucleotide helicity degree [10, 11].

At the Cu^{2+} concentration above 10^{-5} M , the interaction between the metal ions and the poly(I) bases, especially with $C_6=O$ of inosine, occurs. This interaction has a positive cooperativity ($\omega = -1.3$) and association constant $K_{c=0} = 4,6 \cdot 10^3\text{ M}^{-1}$. This binding causes destabilization of the polymer and the helicity degree decrease down to the transition to the coil conformation. The cuprum ions binding with poly(I) at the coiled conformation induces the formation of intermolecular bonds, that has an effect on the sharp increase of $[\eta]$ as well as on the great increase of the absorption band intensity $C_6=O$. The association constant and cooperativity parameter of Cu^{2+} ions interacting with bases of poly (I) at coil conformation are $K_{c=0} = 10^3\text{ M}^{-1}$ and $\omega = -1.2$ respectively.

The larger concentration of the Cu^{2+} leads to the polymer aggregation.

ACKNOWLEDGMENT

The work has been performed under the financial support of the Civilian Research and Development Foundation (CRDF Grant UN1-435).

Authors thank Valeev V. A. and Degtar M. for their assistance.

REFERENCES

1. Fiers W., Contreras R., De Wachter R. et al. // *Biochimie*. 1971. 53. P. 495-506.
2. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1959. 45. P. 482-499
3. Freerksen D. L., Shin P. C.-F., Vasta-Russell J. F. et al. // *Analytical Biochemistry*. 1990. 189. P. 163-168.
4. Simard C., Savoie R. // *Biopolymers*. 1994. 34. P. 91-100
5. Simard C., Gaudreau E., Savoie R. // *Biopolymers*. 1996. 38. P. 329-338
6. Howard F. B., Miles H. T. // *Biochemistry*. 1982. 21. P. 6736-6745
7. Thiele D., Guschlbauer W. // *Biophysik*. 1973. 9. P. 261-277
8. Miles T., Frazier J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1978. P. 8037-8038
9. Shin Y. A. // *Biopolymers*. 1973. 12. 11. P. 2459-2475.
10. Blagoi Yu. P. et al. Metalocomplexes of nucleic acids in solution // *Naukova Dumka*. 1991. P. 270.
11. Sorokin V. A., Levchenko I. V., Valeev V. A., Blagoi Yu. P. // *Molec. Biol.* 1988. 22. 1. P. 151-158.
12. Sorokin V. A., Antonova O. A., Valeev V. A. // *J. Inorg. Biochem.* 1984. 20. 4. P. 299-311.
13. Sorokin V. A., Blagoi Yu. P., Valeev V. A., Antonova O. A. // *Kharkov*. 1983. P. 54.
14. Berger N. A., Eichhorn G. L. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1971. 93. 25. P. 7062-7069.
15. Maskos K. // *Acta biochim. Polon.* 1978. 25. 2. P. 113-127.
16. Zimm B., Crothers D. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1962. 48. P. 905-911.
17. Kalvin N. N., Veljainov S. Yu. // *J. of polym. struct.*, 1987. 4. 592-597.
18. Fritzsche H. // *J. Mol. Struct.* 1991. 242. P. 245
19. Kornilova S. V., Hackl E. V., Kapinos L. E. et al. // *Acta Biochimica Polonia*. 45 (1998) 107.

ВИВЧЕННЯ ДІЇ ІОНІВ Cu^{2+} НА КОНФОРМАЦІЮ POLY(I) В РОЗЧИНІ МЕТОДАМИ ВІСКОЗИМЕТРІЇ ТА ІЧ СПЕКТРОСКОПІЇ.

Д. М. Григор'єв, Г. Жучкова, В. Андрущенко, С. В. Корнілова, Ю. П. Благой.

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної Академії наук України

Робота присвячена вивченню взаємодії Cu^{2+} з poly(I) в розчині ($0,1\text{M Na}^+$, $\text{pH}=6$) методами віскозиметрії, УФ- та ІЧ- спектроскопії. Отримані залежності характеристичної в'язкості $[\eta]$ та ступеню спіральності Θ poly(I) від вмісту Cu^{2+} , а також ІЧ спектри комплексів poly(I) з Cu^{2+} в розчині. Одержані данні дозволили розрахувати ступень зв'язування (С) та константи зв'язування (К) іонів Cu^{2+} з одно-ланцюговою poly(I) . Показано, що при малих концентраціях (нижче 10^{-5}M) іони Cu^{2+} зв'язуються з фосфатними групами poly(I) . При концентрації Cu^{2+} вище 10^{-5}M відбувається взаємодія між іонами металу та основами poly(I) , переважно з $\text{C}_6=\text{O}$ інозину. Це зв'язування спричиняє дестабілізацію полімеру та зменшує ступень спіральності до переходу в клубкову конформацію. Іони міді, зв'язуючись з poly(I) в клубковій конформації, викликають формування міжмолекулярних зв'язків, що проявляється в різкому зростанні $[\eta]$, а також в великому зростанні інтенсивності полоси поглинання $\text{C}_6=\text{O}$. Більш високі концентрації Cu^{2+} ведуть до агрегації полімеру.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Поліінозинова кислота, Cu^{2+} , характеристична в'язкість, ІЧ спектроскопія, ступень спіральності, ступень зв'язування.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 536.421.4:543.51

MASS SPECTROMETRIC STUDY OF LIQUID SOLUTION OF AMINO ACID
PROLINE IN ETHANOL AT TEMPERATURES BELOW 0°C

O.A. Boryak, M.V. Kosevich, V.S. Shelkovsky

*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,
47, Lenin Ave., Kharkov, 61164, Ukraine. E-mail: boryak@ilt.kharkov.ua*

Received: June 10, 2000

A possibility of qualitative and semi-quantitative estimate of the composition of liquid solutions of organic and inorganic compounds in a cryoprotector solvent at temperatures as low as -130÷ -100°C by means of low temperature FAB/SIMS mass spectrometry is demonstrated on the example of solutions of amino acid proline and NaCl in ethanol. Method of deriving information on these solutions from analysis not only of molecular but of cluster ions as well is described. Ratio of ethanol to solute in the liquid eutectic is estimated as 8:1 for water and NaCl and up to 40:1 for proline. Continuous monitoring of changes in ion currents of various ions with temperature increase allowed to observe fine peculiarities of thawing process.

KEY WORDS: proline, ethanol, cryoprotector solution, low temperature mass spectrometry, secondary emission

Evaluation of various parameters of solutions of biomolecules at reduced temperatures and, in particular, development of methods of determination of composition of such solutions comprise an interesting task of molecular biophysics and cryobiology. In a series of our recent works [1-6] possibilities of application of low temperature (LT) fast atom bombardment (FAB) and secondary ion mass spectrometric (SIMS) techniques in cryobiological studies was demonstrated. All results for water solutions at temperatures below 0°C [1-3, 7, 8], however, were obtained for solid state, since high value of saturated vapour pressure of water and water solutions does not permit studies of these objects in the liquid state under low pressure (10^{-4} - 10^{-6} Pa) experimental conditions of mass spectrometric set up. Organic liquids with low vapour pressure, glycerol at the first place, which are used as liquid matrices in ambient FAB mass spectrometry [9], show significant increase of viscosity with temperature decrease, which hampers obtaining of meaningful spectra using glycerol solutions at temperatures below -70°C [1]. In this connections it was necessary to look for some other solvents which remain liquid at more low temperatures at low pressure.

Our previous research showed that ethanol (more precisely, ethanol-water azeotropic mixture of 95.5% of ethanol) can exist in the liquid state in the -130°C to -100°C temperature range under the LT FAB mass spectrometric conditions [4-6]. Ethanol possesses pronounced cryoprotector properties and is utilised in cryotechnology, but not in biological cryoprotection because of its high toxicity [10].

The aim of the present work was to examine a possibility of investigation of solutions of some simple organic and inorganic compounds in ethanol in the liquid state at low temperatures by means of LT FAB/SIMS. The results obtained for ethanol solutions of an amino acid proline which plays a certain role in cryoprotection and has the highest among amino acids solubility in ethanol and for NaCl as the main salt constituent of biological fluids are presented.

EXPERIMENTAL

LT FAB measurements were performed with the help of a magnetic mass spectrometer MI-1201E («Electron» Works, Sumy, Ukraine) equipped with a secondary ion source with a cryogenic unit for cooling of the sample, described in Ref. [11]. The cryogenic block consisted of a hollow copper cylinder cooled by liquid nitrogen. A pilot groove was made in the cylinder to house a removable copper sample holder. The temperature of the sample holder was measured by a thermistor. Temperature of the sample was either controlled by the change of flow of nitrogen vapours or increased with the rate of $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ due to spontaneous thermal leak. Argon with primary beam energy of 4.5 keV was used as a bombarding gas.

Some experiments were performed on VG-ZAB-SEQ double focusing mass spectrometer characterised by a larger mass range and higher resolutions, described elsewhere [5, 6]. SIMS mode was applied using 30 keV Cs^+ primary bombarding beam. Only spontaneous thawing (with the rate of $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) without temperature control was available on this experimental set-up. This drawback was compensated by an advanced software which allowed construction of so called ion chromatograms (or thermograms in the case of temperature change in the course of measurements), that is the continuous plot of the value of relative ion current I_{rel} of any ion in the spectrum on time.

Amino acid L-Proline was purchased from «Reanal», Hungary. Freshly distilled ethanol (which is 95.5 wt% azeotropic mixture with water) was used. A 0.01 M solutions of the amino acid and a saturated solution of NaCl

Mass spectrometric study of liquid solution of amino acid proline ...

(10 μ L droplet) were frozen on a copper or steel sample holder in vapours of liquid nitrogen with the rate of $100^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Preceding the description of results on solutions, the main features of temperature dependencies of the LT FAB mass spectra of ethanol azeotrope with water, revealed in our previous works [4-6], are to be outlined. It was shown that no meaningful spectrum can be produced from the sample in the solid state in the lowest temperature range; the threshold for ion production on thawing is connected with the appearance of the liquid phase in the sample due to melting of eutectic [12], while the subsequent termination of the cluster-type spectrum is connected not with exhaustion, but with the self-freezing of the liquid due to intense evaporation. Monitoring of thermogram of ion current allowed to determine the temperature range for existence of the liquid phase, which is about -130°C to -100°C [6]. LT FAB/SIMS mass spectrum of liquid ethanol at subzero temperatures is characterised by high absolute intensities of the peaks, low level of fragmentation, presence of cluster ions and practical absence of chemical noise. The spectrum is comprised by a set of abundant protonated neat ethanol (E) clusters E_nH^+ and less intense sets of hydrate clusters $\text{E}_n\text{W}_m\text{H}^+$ (W is for water molecule). It was shown that the obtained distribution of clusters correlates qualitatively with the distribution expected from the statistical probability of inclusion of two components into a cluster (associate) of a definite size, but the qualitative ratio of abundances is affected by the relative stability of the clusters and their decay under mass spectrometric conditions [5].

The temperature changes of the frozen amino acid solutions in ethanol were the same as those for ethanol solvent. The eutectic temperature of the triple ethanol-water-amino acid mixture appeared to be nearly the same as that of water-ethanol mixture. LT FAB and LT SIMS spectra obtained on two different experimental set-ups appeared to be qualitatively similar and reproducible.

In Fig. 1 the LT FAB mass spectrum of proline in ethanol is presented. The spectrum contains the same abundant sets of ethanol and water-ethanol clusters as the pure solvent and less abundant set of proline (P) containing clusters (Fig. 1a), starting from protonated proline PH^+ , m/z 116 and continued by its clusters with ethanol PE_nH^+ ($n = 1-7$) (Fig. 1b). In the LT SIMS mass spectrum recorded with higher sensitivity and resolution (Fig. 2) clusters with n up to 15 were distinguished. There is no information on the clusters which may contain two proline molecules, as the mass value of the proline dimer coincide with that of the ethanol pentamer, E_5H^+ . Clusters of proline with water, if any, do not exceed the level of background peaks, obviously, due to low content of water in the sample as a whole.

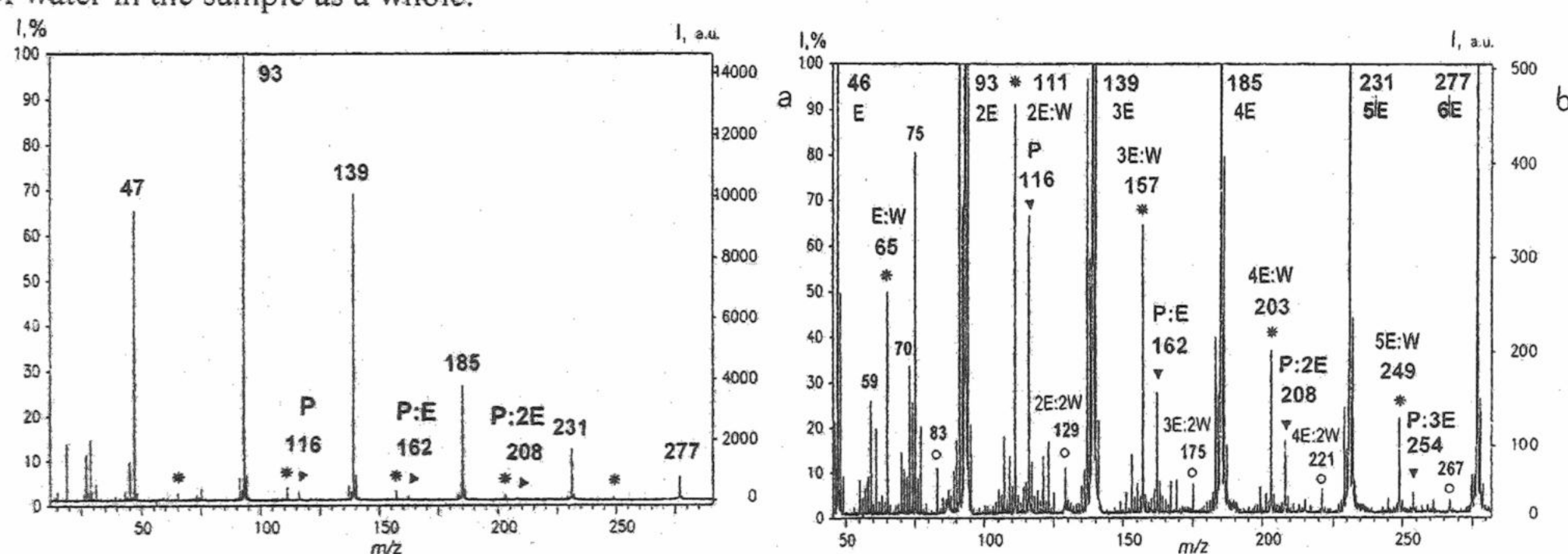


Fig.1. LT FAB mass spectrum of amino acid proline in ethanol: general (a) and enlarged (b) views. Designations: P - proline, E - ethanol, W - water molecules; clusters of P with E - ∇ , clusters of E with one W - $*$ and E with 2W - $\circ$ (all clusters are protonated).

In Fig. 3 ion thermograms of some selected ions: neat alcohol clusters EH^+ , m/z 93, 2EH^+ , m/z 139, protonated proline PH^+ , m/z 116 and total ion current (TIC) are shown. The plots for proline-ethanol PE_nH^+ clusters behaved similar to those of neat E_nH^+ clusters, described in [6]. It follows from the plots that after the melting threshold there is 6 minutes interval of steady cluster ion production. In this time interval the temperature of the sample holder rises from about -130°C to -100°C , but the temperature of the sample surface may differ from that of the sample holder due to intense evaporation of the liquid. The cooling of the surface cause self-freezing of the liquid [6, 10]; obviously, it is accompanied by expelling of the solute to the surface, which lead to significant increase of PH^+ ion at scans #32-35 (see Fig. 3). Thus, fine peculiarities of freezing of solutions can be monitored by LT FAB/SIMS.

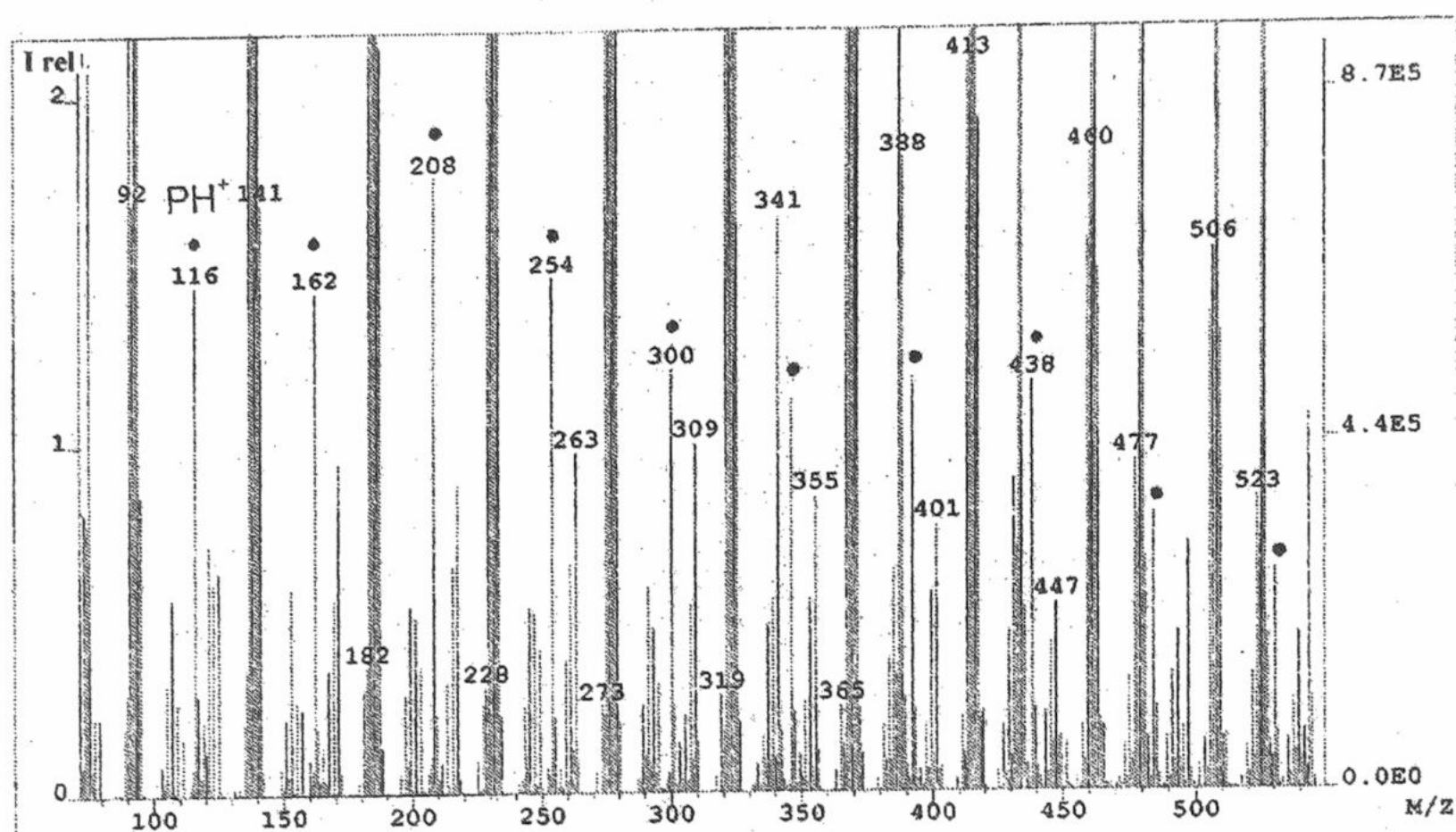


Fig. 2. Enlarged part of LT SIMS mass spectrum of proline in ethanol, recorded on VG-ZAB-SEQ instrument.
 ● - Proline-ethanol clusters PE_nH^+ with $n = 0-9$.

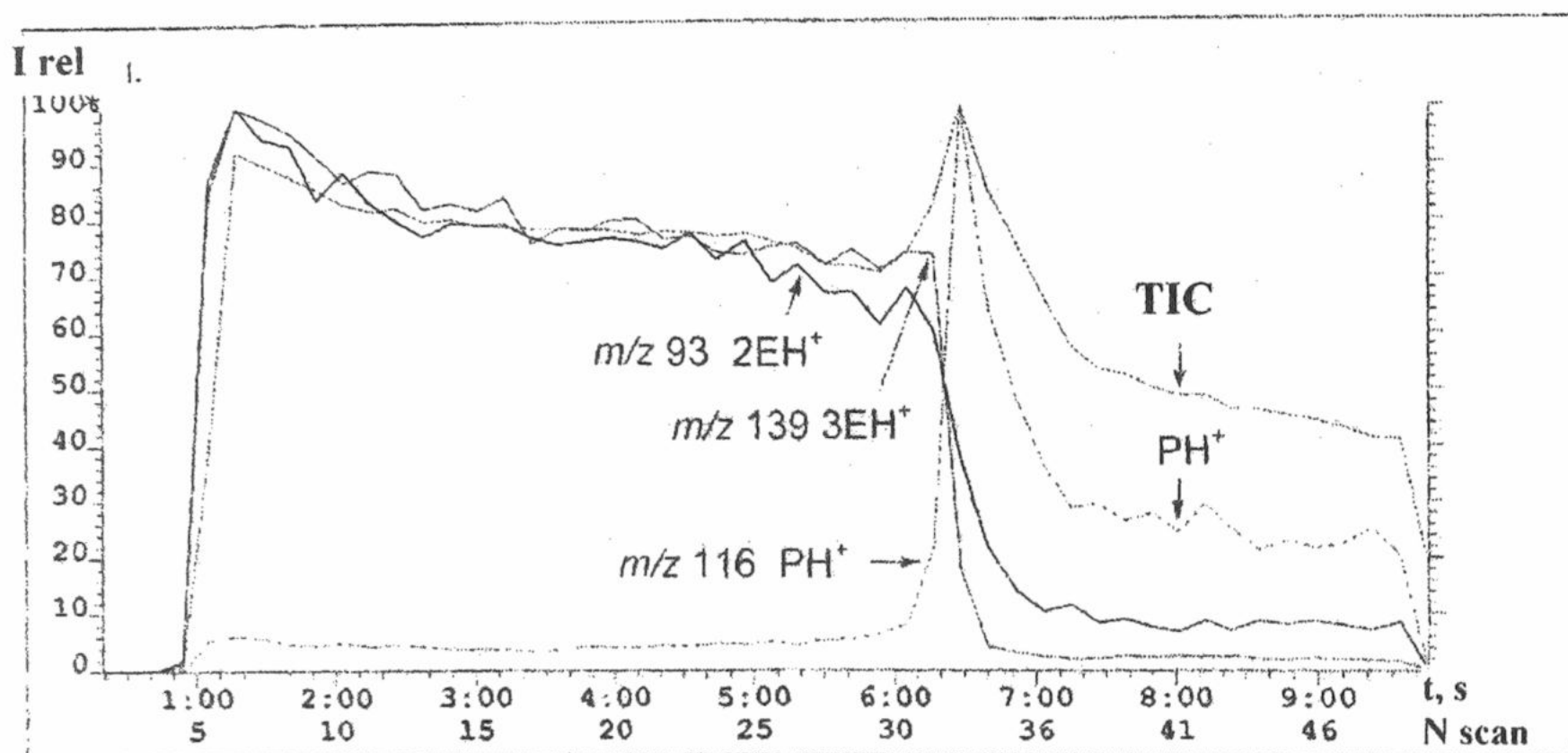


Fig. 3. Thermograms of selected ions, recorded in LT SIMS spectrum.

It is of interest to compare LT FAB mass spectrum of proline in ethanol with that obtained with glycerol matrix at ambient conditions, the latter presented in Fig. 4. It contains abundant peak of protonated proline PH^+ , m/z 116, less abundant dimer $2PH^+$, m/z 231, and a number of characteristic fragments, the most prominent of which are $[P - COOH]^+$ at m/z 70 and m/z 43, 30. There are two substantial differences in the two types of spectra. Firstly, the efficiency of fragmentation is much higher in the case of ambient spectra from glycerol (e.g. a fragment at m/z 70 comprises ~60% of the molecular ion peak) than in the case of low temperature spectra from ethanol (where the yield of the fragments does not exceed 10-12%). Secondly, there are no peaks of glycerol matrix in the corresponding spectrum (so-called «suppression» effect [13]), which points to the surface activity of the analyte in relation to a matrix compound, that is glycerol. At the same time suppression effect is not observed for ethanol solutions of proline. There may be two explanations for the latter distinction. On the one hand, proline may not exhibit high surface activity in relation to ethanol which is better solvent for less polar compounds. On the other hand, different mechanisms of secondary ion production may work for liquid glycerol and ethanol: direct ion sputtering from the surface of glycerol matrix and phase explosion mechanism [14] for ethanol, which involves explosive non-equilibrium process of formation of gas bubbles with even mixing of the constituents of the liquid. The switching from the explosive to desorption mechanism with the increase of the viscosity of self-freezing ethanol may be a reason for increase of the monomer PH^+ peak (see scan #34 in Fig. 3).

It is of application interest for cryobiology (cryoprotection) to estimate the concentration of the solute in the liquid phase at low temperatures. Quantitative estimates, however, are rather difficult, since they necessitate account of many factors, including influence of the ionizing agent on the system under study. Under gas-phase mass spectrometric conditions the use of reference compounds and knowledge of ionization efficiencies enables

Mass spectrometric study of liquid solution of amino acid proline ...

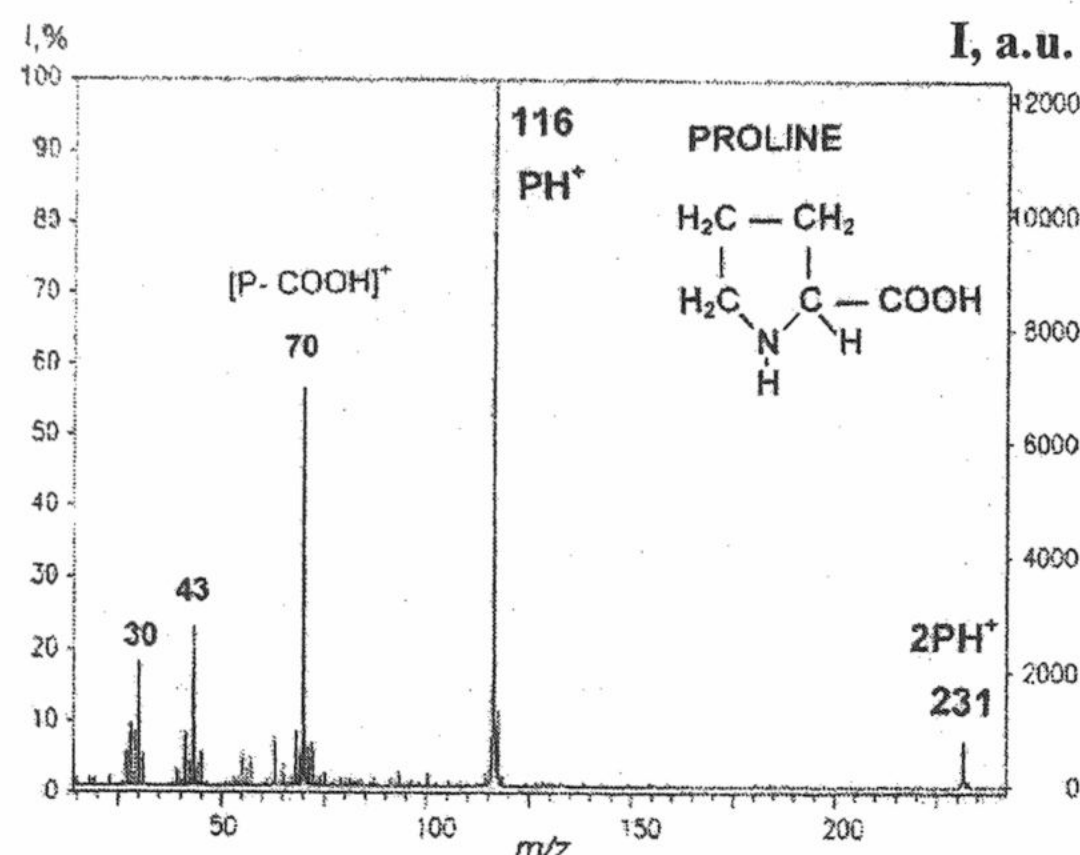


Fig.4. Ambient FAB mass spectrum of proline dissolved in glycerol matrix. Any signals of glycerol are absent due to suppression effect.

(and differs from the eutectic concentration in several percent only) can be used as internal standard. Comparison of the abundance of similar cluster ions E_nWH^+ and E_nPH^+ (see Fig. 1 b) shows, that they are of the same order of magnitude, proline containing clusters intensity being in average 3-5 times lower than that of water-containing ones. Since ethanol:water molar ratio in the system was estimated as 8:1, ethanol:proline ratio may be about (24:40):1.

Tests with ethanol solutions of some more amino acids were made. While the results were qualitatively similar, the absolute abundances of amino acids peaks were much lower obviously due to their lower solubility in ethanol. The test of proline solution in one more primary alcohol methanol gave results similar to those of ethanol solution.

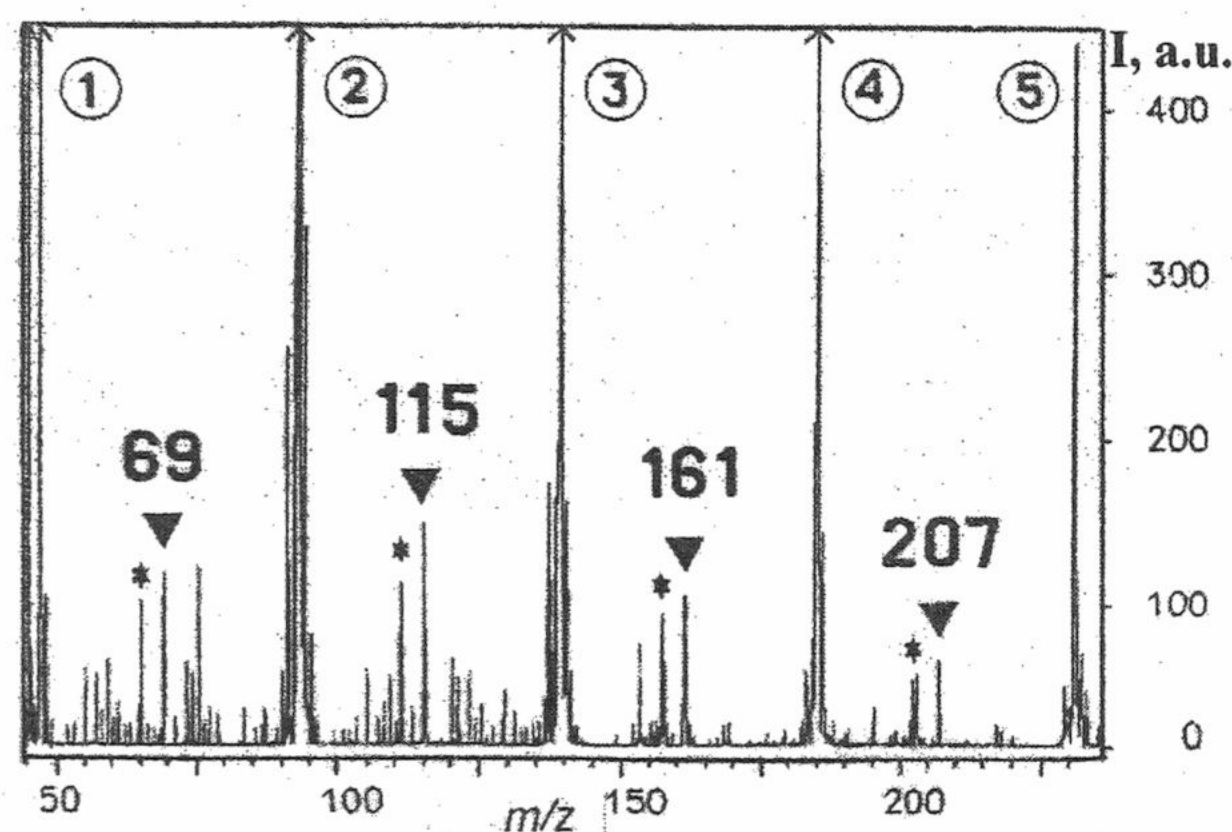


Fig.5. LT FAB mass spectrum of saturated solution of NaCl in ethanol recorded at -110°C . Designation: * - E_nWH^+ , ▼ - E_nNa^+ , numbers in circles correspond to "n" in E_nH^+ clusters.

observed phenomena can be described as an application of ethanol as a liquid matrix for measurements at low temperatures.

CONCLUSIONS

Examination of solutions of organic (amino acid proline) and inorganic (NaCl) compounds in ethanol by means of LT FAB/SIMS technique allowed to come to following conclusions. Presence of the solute in cryoprotector-ethanol solution at temperatures as low as $-130 \div -100^\circ\text{C}$ is reflected in the composition of molecular and cluster ions recorded in the FAB/SIMS spectra. Production of informative ions from the liquid media at so low temperatures is reported for the first time. Approximate estimate of the solute content in eutectic can be made using water, present in the distilled ethanol, as an internal standard. Molar ratio of ethanol to solute

quantitative analysis. Under FAB conditions proton affinities of the matrix and the analyte predetermines abundance of the corresponding molecular ions. In the case of LT FAB mass spectra of ethanol solutions not only a single molecular ion, but sets of cluster ions reflect the relative concentration of the components. It was shown in MS/MS studies [15], that the preferential center of protonation in the mixed ethanol-water clusters is connected with ethanol, which makes the probability of protonation of neat and mixed clusters nearly equal; at the same time the energy of the hydrogen bonds formed by all components of the system is of the same order of magnitude. All this means that the inclusion of all components into a cluster must be governed, in the first approximation, by the statistical probability laws. On this basis water which concentration is known for distilled ethanol

In Fig. 5 LT FAB mass spectrum of solution of NaCl in ethanol is presented. Saturated NaCl solution was prepared at room temperature, but the concentration of the liquid phase in the sample at the temperatures of the spectrum recording corresponds to the eutectic one and is rather low, as it follows from the low relative abundance of E_nNa^+ clusters ($n = 1-6$) in Fig. 5. Anyway, some share of sodium ions, comparable with that of water, is left in solution at temperatures as low as $-130 \div -100^\circ\text{C}$. Using the same approach as described above for proline one can say that ethanol:NaCl ration is around 8:1.

From the purely mass spectrometric point of view the

was estimated as 8:1 for water and NaCl and up to 40:1 for proline. Suppression of the matrix signals in ambient FAB spectra of proline in glycerol and the absence of the suppression in LT FAB of ethanol solutions can be explained both by surface-active properties of proline and differences in the mechanisms of ion production for the two types of liquid matrices. Monitoring of ion thermograms allowed to observe absence of noticeable changes in the sample composition during about 5 minutes of thawing and subsequent increase of abundance of molecular ion of proline due to expelling of the solute to the surface cooled due to rapid evaporation.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors are grateful to Dr. Karoly Vékey and Dr. Agnes Gömory for possibility to make some experiments on VG-ZAB-SEQ instrument. This work was partially supported by INTAS-99-00478 grant.

REFERENCES

1. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. // Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1995. V. 9, N 11. P. 978-984.
2. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С., Благоев Ю.П. // Биофизика. 1996. V. 41, N 6. С. 1207-1213.
3. Kosevich M.V. // Europ. Mass Spectrom. 1998. V. 4, N 4. P. 251-264.
4. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S. // Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc. 1997. V. 163, N 3. P.177-184.
5. Kosevich M.V., Czira G., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Vekey K. // Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1997. V. 11, N 13. P. 1411-1416.
6. Kosevich M.V., Czira G., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Vekey K. // J. of Mass Spectrom. 1998. V. 33, N 9. P. 843-849.
7. Boryak O.A., Stepanov I.O., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. // Europ. Mass Spectrom. 1996. V. 2, N 6. P. 329-339.
8. Косевич М.В. // Вісник Харківського університету N 422. Біофізичний вісник. 1998. вип. 2. С. 5-14.
9. DePauw E. // Mass Spectrom. Rev. 1986. V. 5, N 2. P. 191-212.
10. Третьяков Ю.Д., Олейников Н.Н., Можаяев А.П. Основы криохимической технологии. М.: Высш. школа, 1987. 143 с.
11. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С. // Приборы и техника эксперимента. 1993. N 6. С. 176-181.
12. Kosevich M.V. // Europ. Mass Spectrom. 1997. V. 3, N 4. P. 320-322.
13. Ligon W. V., Dorn S. B. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1986. V. 78, N 1. P. 99-113.
14. Sunner J., Ikonomou M.G., Kebarle P. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1988. V. 82, N 3. P. 221-237.
15. Karpas Z., Eiceman G.A., Ewing R.G., Harden C.S. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1994. V. 133, N 1. P. 47-58.

МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РІДКОГО РОЗЧИНУ АМІНОКИСЛОТИ ПРОЛІНУ У ЕТАНОЛІ ПРИ ТЕМПЕРАТУРІ НИЖЧЕ 0°C

О.А. Боряк, М.В. Косевич, В.С. Шелковський

*Фізико-технічний інститут низьких температур ім Б.І. Веркіна Національної Академії Наук України
пр. Леніна 47, Харків, 61164, Україна*

Показано можливість якісної та напівкількісної оцінки складу рідких розчинів органічних та неорганічних сполук у кріопротекторному розчиннику за температур $-130 \div -100^\circ\text{C}$ методом низькотемпературної БША/ВІМС мас-спектрометрії на прикладі розчинів амінокислоти проліну та NaCl у етанолі. Описано методику отримання інформації стосовно цих розчинів з аналізу не тільки молекулярних, а й кластерних іонів. Молярне відношення етанолу до речовини у розчині оцінено як 8:1 для води та NaCl і майже 40:1 для проліну. Постійне контролювання змін іонних струмів окремих іонів в залежності від зростання температури дозволяє спостерігати особливості процесу плавлення.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пролін, етанол, розчини кріопротекторів, низькотемпературна мас-спектрометрія, вторинна емісія.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

КОНФОРМАЦИОННАЯ ИЗОМЕРИЯ МОЛЕКУЛ РИБОЗЫ И 2-ДЕЗОКСИРИБОЗЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ В НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ИНЕРТНЫХ МАТРИЦАХ.

С.А. Краснокутский, А.Ю. Иванов, Г.Г. Шеина, Ю.П. Благой

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, 61164 Харьков пр. Ленина, 47.

Поступила в редакцию 16 июня 2000 г.

Конформационное поведение молекул рибозы и 2-дезоксирибозы было исследовано методами спектроскопии матричной изоляции и квантово-химическими расчетами. В диапазоне $4000\text{--}450\text{ см}^{-1}$ получены ИК-Фурье спектры данных молекул, изолированных в низкотемпературных матрицах Ar, Ne. Ab initio методами HF/3-21G(p) и HF/6-31G(d,p) проведены расчеты относительной стабильности конформационных изомеров. Сравнением экспериментальных и рассчитанных квантово-химическими методами спектров определены три конформера 2-дезоксирибозы, фиксируемые в матричных образцах при температурах 5-30 К. Обнаружено, что в матрично-изолированных конформерах рибозы и 2-дезоксирибозы все ОН группы участвуют во внутримолекулярных водородных связях. Отжигом матричных образцов определена нижняя граница (2,5 ккал/моль) высот барьеров конформационных переходов.

Ключевые слова: рибоза, квантово-химические расчеты, матричная изоляция, ИК-Фурье спектроскопия.

Конформационная природа структурных составляющих ДНК и РНК (2-дезоксирибоза, рибоза, основания, нуклеозиды) интенсивно исследовалась разнообразными экспериментальными и расчетными методами [1,2]. Особый интерес представляет изучение внутримолекулярных водородных связей, которые могут играть важную роль в стабилизации структуры биомолекул [1-5]. Возможности большинства экспериментальных методов в подобных исследованиях ограничивает конкурентное влияние межмолекулярных взаимодействий. В то же время, спектроскопия матричной изоляции обладает высокой разрешающей способностью и отсутствием сильных межмолекулярных взаимодействий в инертных низкотемпературных матрицах, что делает данный метод идеальным для изучения внутримолекулярных водородных связей [6]. Однако, до настоящего времени, применение метода матричной изоляции было ограничено исследованиями простейших фрагментов биополимерных молекул - нуклеотидных оснований и некоторых аминокислот. Полностью отсутствовали исследования таких важных молекул, как моносахариды. Это обусловлено тем, что температура сублимации большинства сахаров практически совпадает с температурой термического разложения и последующей карамелизации [7]. Также в неполярных растворителях могли быть изучены исключительно модельные сахара с замещенными ОН группами [7].

В предыдущих работах [8,9] мы впервые показали возможность исследования моносахаридов - глюкозы, рибозы, 2'-дезоксирибозы и содержащих рибозные кольца нуклеозидов - уридина, тимидина, аденозина, спектроскопией матричной изоляции. Объектом исследования данной работы была структура молекул 2-дезоксирибозы и рибозы в изолированном состоянии. Ранее, такие изолированные молекулы могли быть исследованы только расчетными методами, причем основное внимание уделялось конформациям фуранозного кольца рибозы и 2'-дезоксирибозы в составе нуклеозидов [1-5,10,11].

В некоторых случаях изучались модельные соединения с замещенной гидроксильной группой О1Н [12,13]. Подробные исследования конформационных структур известны только для некоторых свободных моносахаридов, таких как глюкоза [14-17] и D-фруктофураноза [18]. В данной работе кроме измерений в Ne и Ar матрицах были выполнены ab initio расчеты для оценки стабильности различных конформаций и интерпретации колебательных спектров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Основные особенности фурье-спектрометра FS-01 и низкотемпературного эксперимента были описаны ранее [8,19,20]. Для данной работы спектральные измерения выполнялись с аподизированным разрешением 0.24 см^{-1} в диапазоне $450\text{--}2500\text{ см}^{-1}$ и 0.4 см^{-1} в диапазоне $1400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Как отмечено в [8], для испарения моносахаридов необходима специальная ячейка Кнудсена с уменьшенными потерями молекулярного пучка. Эффективность такой конструкции на два порядка превосходит эффективность традиционных ячеек Кнудсена в наших предыдущих экспериментах [19,20]. Это позволило получать достаточно интенсивный молекулярный поток при температурах ниже точки плавления, вблизи которой начинается интенсивная

термодеструкция моносахаридов. Для определения абсолютных интенсивностей молекулярного потока и числа молекул инертного газа приходящихся на молекулу вещества (matrix to sample ratio - M/S) использовались низкотемпературные дифференциальные кварцевые микровесы (КМВ) [19]. В данных экспериментах типичная интенсивность молекулярных потоков рибозы и 2-дезоксирибозы составляла около 16.5 нг/(с*см²). Коммерческие (Sigma) вещества - рибоза и 2-дезоксирибоза использовались без дополнительной очистки. Перед напылением вещества отжигались, для удаления легколетучих примесей, а также сорбированных молекул H₂O, CO₂, N₂. Процесс отжига контролировался с помощью КМВ. Были использованы Ne и Ar матрицы при температурах зеркал 5K и 12K соответственно. Инертные газы (Ne, Ar) были более чем 99.99% чистоты. Для проведения квантово-химических расчетов энергий конформеров и колебательных спектров была использована программа GAMESS [21], адаптированная А. Грановским [22] для работы на WINTEL компьютерах. Расчеты относительной стабильности конформеров проводились методами HF/3-21G(p) и HF/6-31G**, а для расчета колебательных спектров использовался метод HF/3-21G(p).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На Рис. 1 представлены ИК-Фурье спектры области валентных (ν) колебаний гидроксильных групп OH 2-дезоксирибозы в низкотемпературных матрицах Ar и Ne.

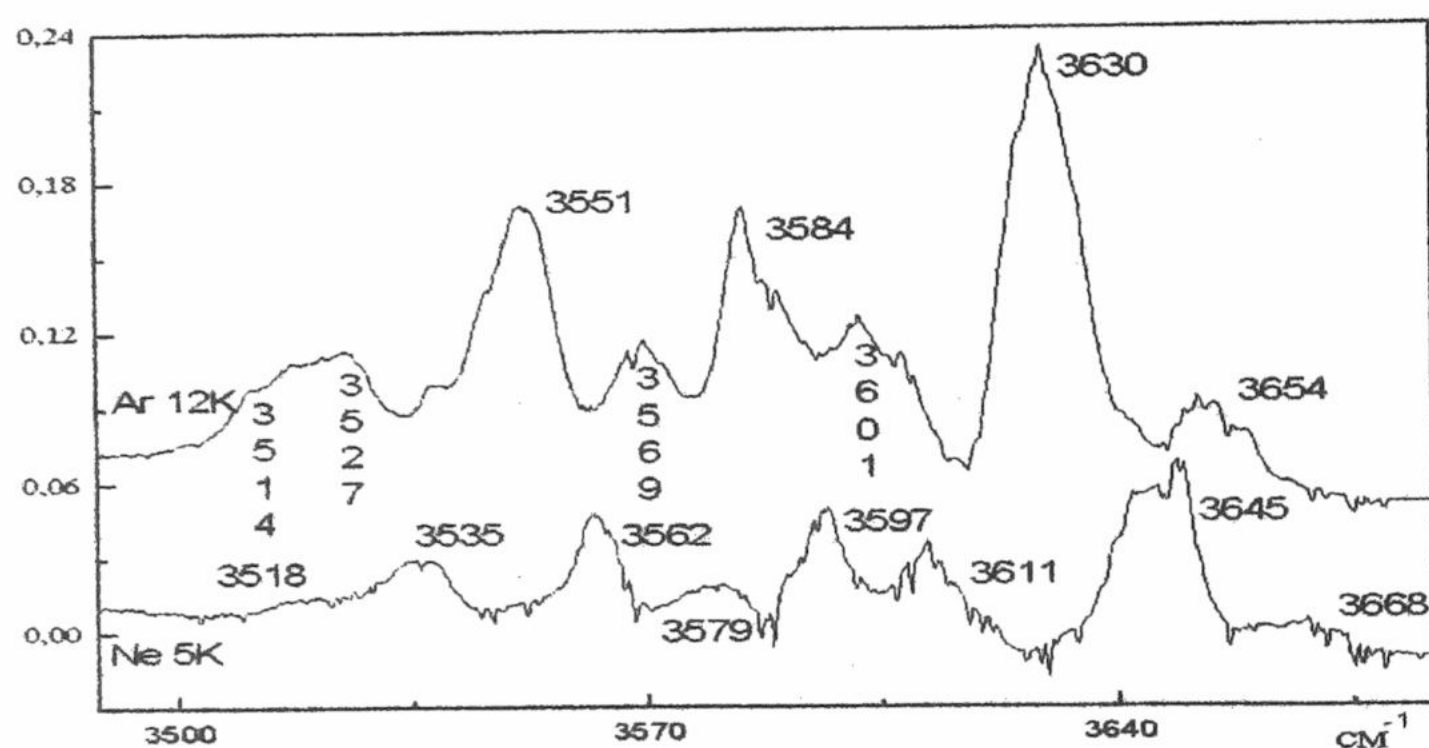


Рис. 1. Область валентных OH колебаний 2-дезоксирибозы в Ar и Ne матрицах. M/S=600 для Ne и M/S=900 для Ar матриц.

Сравнение FTIR спектров в различных матрицах и аппроксимация экспериментального спектра лоренцевыми контурами позволяет выделить пять групп спектральных полос, относящихся к колебаниям трех OH групп (Таб. 1). Ранее предполагалось [8], что столь заметная частотная дисперсия колебаний ν OH

N	1	2	3	4	5
ν (см ⁻¹)	3654	3630	3601	3569	3527
Ar матрица			3584	3551	3514
$\Delta\nu$ (см ⁻¹)	15,5	13,5	12,7	6,8	14,2
			10,6	11,3	13,1
$I_{\text{отн}}$ (%)	7,7	28,4	29	22,9	12
ν (см ⁻¹)	3668	3645	3611	3579	3535
Ne матрица			3597	3562	3518
$\Delta\nu$ (см ⁻¹)	16,7	14,8	11,9	13,6	13,5
			8,5	8,2	11,9
$I_{\text{отн}}$ (%)	8	25,4	28,6	24,3	13,7

Таблица 1. Частоты, полуширины ($\Delta\nu$ -ширина полосы на половинной высоте) и относительные интегральные интенсивности (в процентах от общей интенсивности спектра) спектральных полос ν OH колебаний 2-дезоксирибозы в Ar и Ne матрицах.

рибозы вызвана внутримолекулярными водородными связями в различных конформациях. Конформационную природу дисперсии частот ν OH однозначно подтверждают данные таб. 1, согласно которым интегральные интенсивности каждой группы полос практически совпадают в Ar и Ne матрицах (Таб. 1), что позволяет исключить расщепление полос вызванное матрицей. Мы рассмотрели 5 типов конформационных изомеров с различной структурой внутримолекулярных водородных связей для β -аномера 2-дезоксирибозы (β 1- β 5 на Рис. 2) и 5 типов для α -аномера (α 1 и α 2 показаны на Рис. 2). Также были рассмотрены конформации β 1a- β 4a, в которых поворот одной из OH групп (O5H, O3H - β 1a; O3H - β 2a, β 3a; O1H, - β 4a) исключает водородную связь этой гидроксильной группы с O4 кольца (Рис. 2).

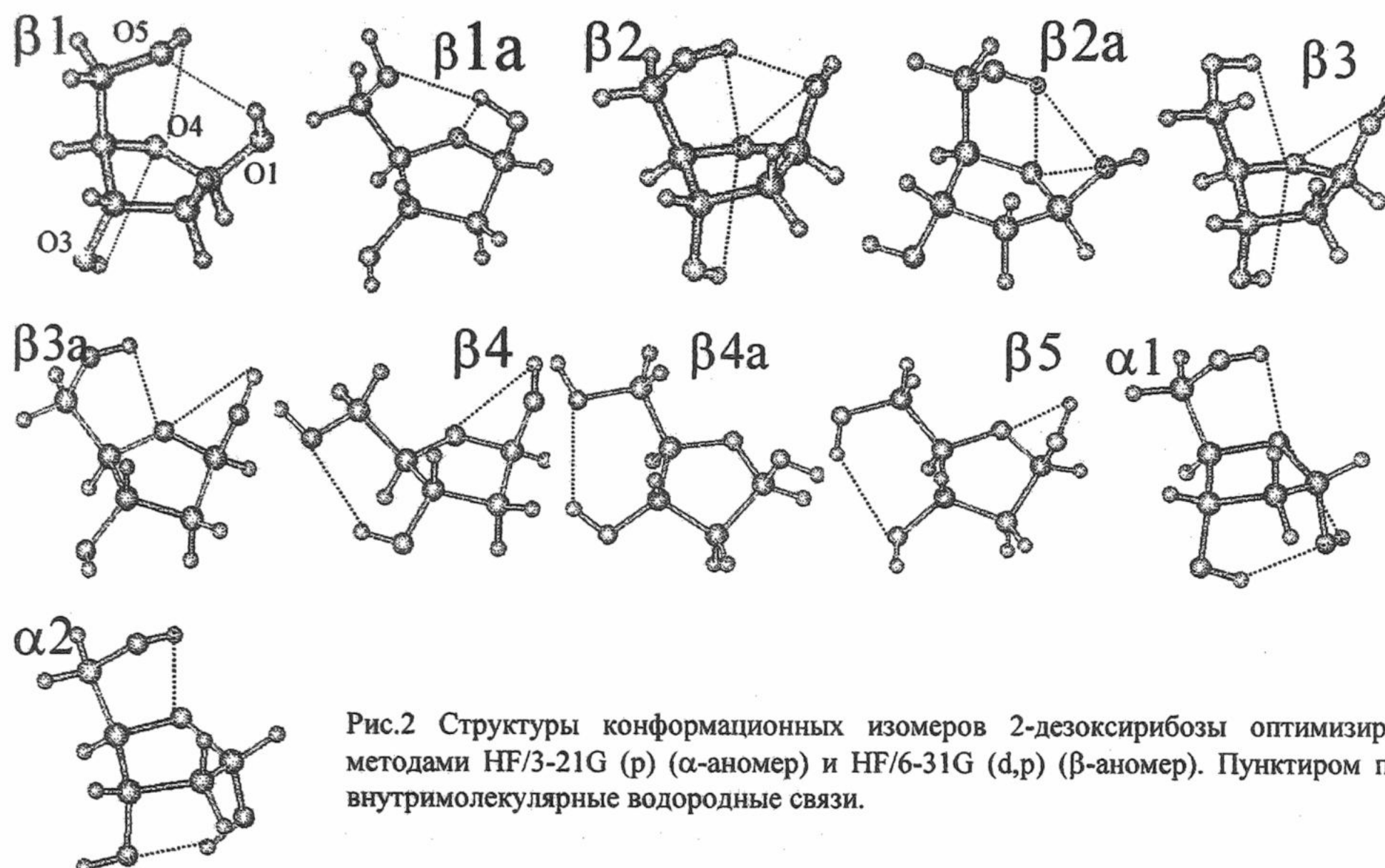


Рис.2 Структуры конформационных изомеров 2-дезоксирибозы оптимизированные методами HF/3-21G (p) (α -аномер) и HF/6-31G (d,p) (β -аномер). Пунктиром показаны внутримолекулярные водородные связи.

Расчеты методами HF/3-21G(p) и HF/6-31G(d,p) показывают стабильность изображенных на Рис. 2 конформационных структур. Диапазон изменений относительной энергии конформеров не превышает 8 ккал/моль (Таб. 2). Для подобных нежестких молекул, расчеты методом Хартри-Фока и даже учет

Таблица 2. Относительные энергии и некоторые структурные параметры конформеров 2-дезоксирибозы

№	1H5*	1H4	3H5	3H4	5H1	5H3	5H4	1H3	3H1	ΔE [ккал/моль]		Структура кольца**
										6-31G(d,p)	3-21G(p)	
$\beta 1$	2.33	2.63		2.71			2.6			4.73	1.5	4T_3
$\beta 1a$	2,1	2.31								1.72	0.4	2E
$\beta 2$		2.51		2.7	2.07					0.8	—	4E
$\beta 2a$		2,5			2,14					0,6	0	$^3T^2$
$\beta 3$		2.54		2.65			2.39			2.72	—	4E
$\beta 3a$		2,52					2,41			0.12	—	2E
$\beta 4$		2,44	2,43							0	0.4	2E
$\beta 4a$			2,42							3,64	6.82	2E
$\beta 5$		2,43				2,35				2	2.06	$^2T^3$
$\alpha 1$		2.49					2.3		1.96	—	-3.52	2T_1
$\alpha 2$							2.27	1.93		—	-1.19	2E

*- $1H_j$ - расстояния в Å между протоном и акцепторным кислородом $O_iH \dots O_j$. ** - Классификация структуры кольца, проведенная по фазовому углу псевдовращения (Т-твист, Е- конверт) [1, 23].

электронной корреляции на уровне MP2 не позволяют с уверенностью выбрать наиболее стабильные конформеры, реально присутствующие в матричном образце. Например, как показано в работе [17], изменения относительной энергии некоторых конформеров глюкозы достигают 7 ккал/моль при переходе от метода HF/сс-pVDZ к методу MP2/сс-pVDZ и 4 ккал/моль при переходе от MP2/сс-pVDZ к MP2/сс-pVTZ. Очевидно, что присутствие в матричном образце всех показанных на Рис. 2 конформеров может приводить к перекрыванию и значительному уширению спектральных полос. Действительно, характерной особенностью данной области спектра является значительная полуширина спектральных полос νOH , в среднем превышающая 10 см^{-1} (Рис. 1, Таб. 1). Это значительно больше, чем полуширина νNH урацила (0.5 см^{-1}), 2-гидроксипиримидина (2 см^{-1}) или полуширина νOH (1.5 см^{-1}) глицина в Ar матрицах. Однако этот эффект не столь значителен, чтобы его нельзя было объяснить другими причинами. Во-первых эксперименты с тетрагидрофураном показали [24], что спектральные проявления высокой конформационной мобильности пятичленного фуранозного кольца в среднем ИК-диапазоне незначительны и могут проявляться главным

образом в уширении спектральных полос. Во-вторых, необходимо учитывать эффект неоднородного уширения спектральных полос, хорошо заметный в спектрах неплюских молекул, например таких как 5,6-дигидроурацил [19]. Неоднородное уширение спектральных полос является следствием конформационной неупорядоченности матричного сайта. После отжига Ag матрицы хорошо заметно сужение спектральных линий (Рис. 3), так как отжиг ведет к уменьшению конформационной неупорядоченности матричного сайта. Теперь в каждой из пяти групп полос (Таб. 1) четко выделяются по три полосы (Рис. 3). Становится понятно,

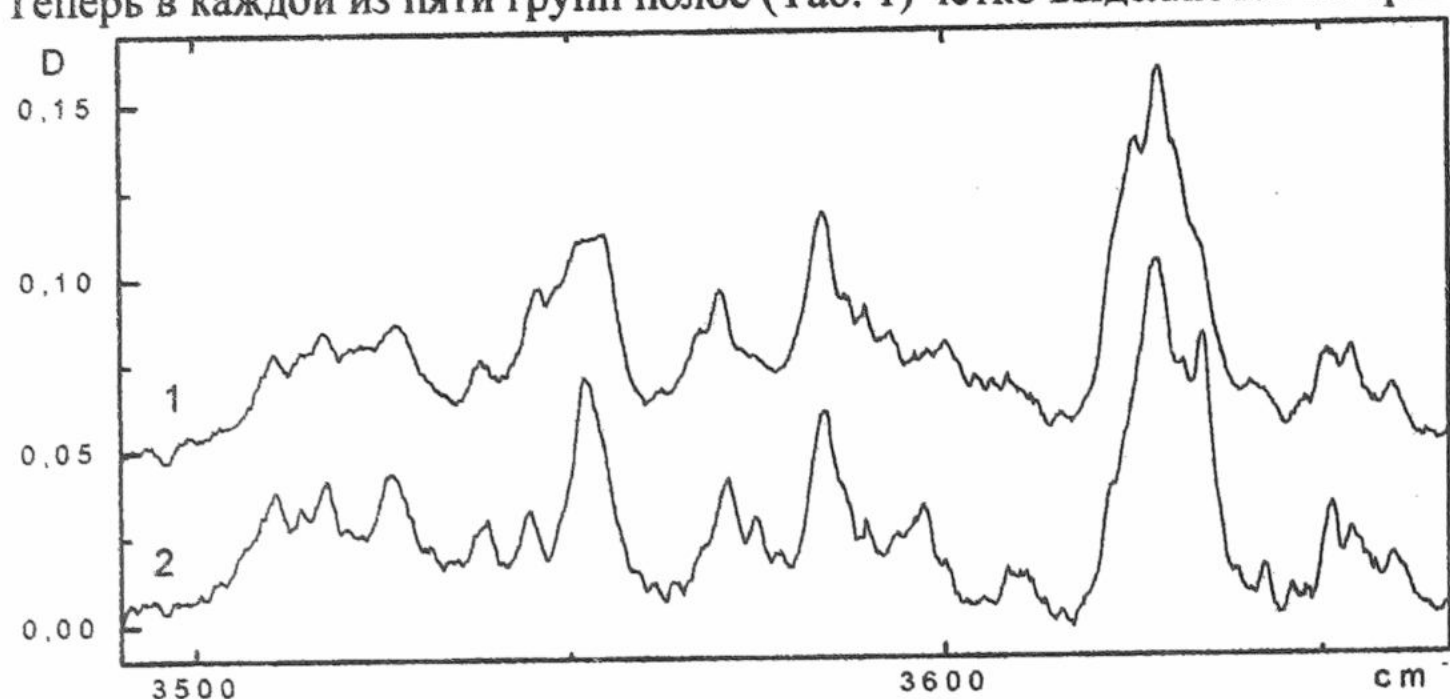


Рис. 3. Влияние отжига матрицы на спектр валентных ОН колебаний 2-дезоксирибозы в Ag матрице (12 К). 1 – до отжига. 2 – после отжига при 30 К, $t=5$ мин.

что только ограниченное число из одиннадцати приведенных на Рис. 2 структур реально присутствует в Ag матрице, так как иначе перекрывание большого числа полос не позволило бы наблюдать структурирование спектра (Рис. 3) при отжиге матрицы. Перекрывание и уширение полос водородно-связанных колебаний (максимум в Ag матрице -3420 см^{-1}) хорошо наблюдается при образовании димеров 2-дезоксирибозы. При отжиге ($T=30\text{ К}$) Ag матрицы ($M/S=500$) около 20% молекул переходят в состав димеров. Необходимо отметить высокие значения интегральной интенсивности полосы димеров 3420 см^{-1} , что вероятно связано с участием всех трех ОН групп в образовании межмолекулярных водородных связей.

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что для определения наиболее выгодных конформеров решающее значение имеет сравнение экспериментальных и расчетных колебательных спектров. Для всех показанных на Рис. 2 конформеров были выполнены квантово-химические расчеты частот и интенсивностей колебательных полос методом HF/3-21G(p). Результаты расчетов для области колебаний νOH показаны в (Табл. 3). Характерной особенностью ab initio расчетов колебательных спектров в гармоническом приближении является завышение значений частот валентных колебаний, особенно заметное в диапазоне νNH , νOH . Поэтому для сравнения частот колебаний экспериментальных и расчетных спектров используют масштабирующие множители. После отнесения одной из полос экспериментального спектра к νOH , величина отношения $\nu\text{OH}_{\text{эксп.}}/\nu\text{OH}_{\text{теор.}}$ будет лучшим выбором масштабирующего множителя для данного диапазона. Мы определили масштабирующий множитель как величину отношения $\nu\text{O3H}_{\text{эксп.}}/\nu\text{O3H}_{\text{теор.}} = 3654/4154 = 0.88$. Расчетное значение $\nu\text{O3H}_{\text{теор.}} = 4152\text{ см}^{-1}$ взято для конформера $\beta 2$ (значения νO3H для $\beta 1$ и $\beta 3$ тоже очень близки, см. Табл. 3) Основанием для отнесения полосы 3654 см^{-1} к νO3H конформеров $\beta 1$ - $\beta 3$ послужил ряд полученных нами экспериментальных фактов. Во-первых было проведено сравнение абсолютных инфракрасных интенсивностей колебательных полос в экспериментальных спектрах 2-дезоксирибозы и тимидина. Измерения абсолютных инфракрасных интенсивностей были выполнены аналогично [19], с погрешностью $\pm 20\%$. Сравнение абсолютной инфракрасной интенсивности полосы ОЗН в тимидине ($\nu\text{O3H}=3642\text{ см}^{-1}$ [8]) и полосы 3654 см^{-1} , отнесенной нами к ОЗН 2-дезоксирибозы, дает практически одинаковые результаты - 9 и 8.5 км /моль соответственно. Во-вторых, полоса 3654 см^{-1} имеет небольшой высокочастотный сдвиг по сравнению с полосой νO3H тимидина и можно провести аналогию с увеличением частот $\nu\text{N}_3\text{H}$ урацила, тимина и валентных колебаний NH_2 группы аденина на $4\text{-}7\text{ см}^{-1}$, по сравнению с аналогичными колебаниями в нуклеозидах - урдине тимидине и аденозине. Наконец в-третьих, полоса 3654 см^{-1} полностью исчезает в спектре рибозы (Рис. 4). Она сдвигается в низкочастотную область из-за участия группы νO3H во внутримолекулярной водородной связи $\text{O3H}\dots\text{O2}$. Понижение частоты валентного колебания группы, являющейся донором протона, представляет общеизвестный факт [2]. Однако, если кислород гидроксильной группы является акцептором протона, то направление сдвига частоты валентного колебания этой группы неочевидно. Сравнение частот ОЗН в конформациях $\beta 1a$, $\beta 2a$ и $\beta 5$ (Таб. 2) показывает, что частота колебания νOH акцепторной группы может

Таблица 3. Частоты и интенсивности валентных колебаний ОН групп конформационных изомеров.

Диапазон	3700-3672		3672-3640		3640-3610		3610-3580		3580-3550		3550-3500	
	ν	I	ν	I	ν	I	ν	I	ν	I	ν	I
Эксперимент в Аг матрице			3654	8,5	3630		3601 3584		3569 3551		3523 3514	
Отнесение (эксп. полос)			νO3H , ($\beta\text{1}-\beta\text{3}$)		νO1H , νO5H ($\beta\text{1}-\beta\text{3}$)		νO1H , νO5H ($\beta\text{1}-\beta\text{3}$)		νO5H , (β2)		νO1H , (β1)	
Конформер β1			νO3H 3655,7 νO5H 3648,8	36 68					νO1H 3563,5	177		
β2			νO1H 3668,1 νO3H 3653,7 νO5H	56 24					νO5H 3579,7	215		
β3			νO1H 3672,1 νO3H 3652,7 νO5H 3656,2	49 23 40								
β1a	νO3H 3677,4 νO5H 3695,9	33 64									νO1H 3535,6	288
β2a	νO3H 3673	28	νO1H 3663,3	55					νO5H 3565,6	232		
β4	νO1H 3684,4 νO5H 3689,7	36 45			νO3H 3637,8	84						
β4a	νO5H 3693,2	50	νO1H 3667,7	42	νO3H 3632,5	100						
β5	νO3H 3681,8	46,8	νO1H 3666,8	52	νO5H 3620,5	122						
α1			νO1H 3663,4 νO5H 3668,2	55 35	νO3H 3610,6	131						
α2	νO3H 3675	37	νO5H 3660,1	43			νO1H 3605,4	134				

ν -частота в см^{-1} , I- абсолютные ИК-интенсивности в км/моль .

возрастать на несколько см^{-1} по сравнению с колебанием свободной группы. Данный вывод подтверждают расчеты и эксперимент, согласно которым частота акцепторной группы ОН в димерах метанола возрастает

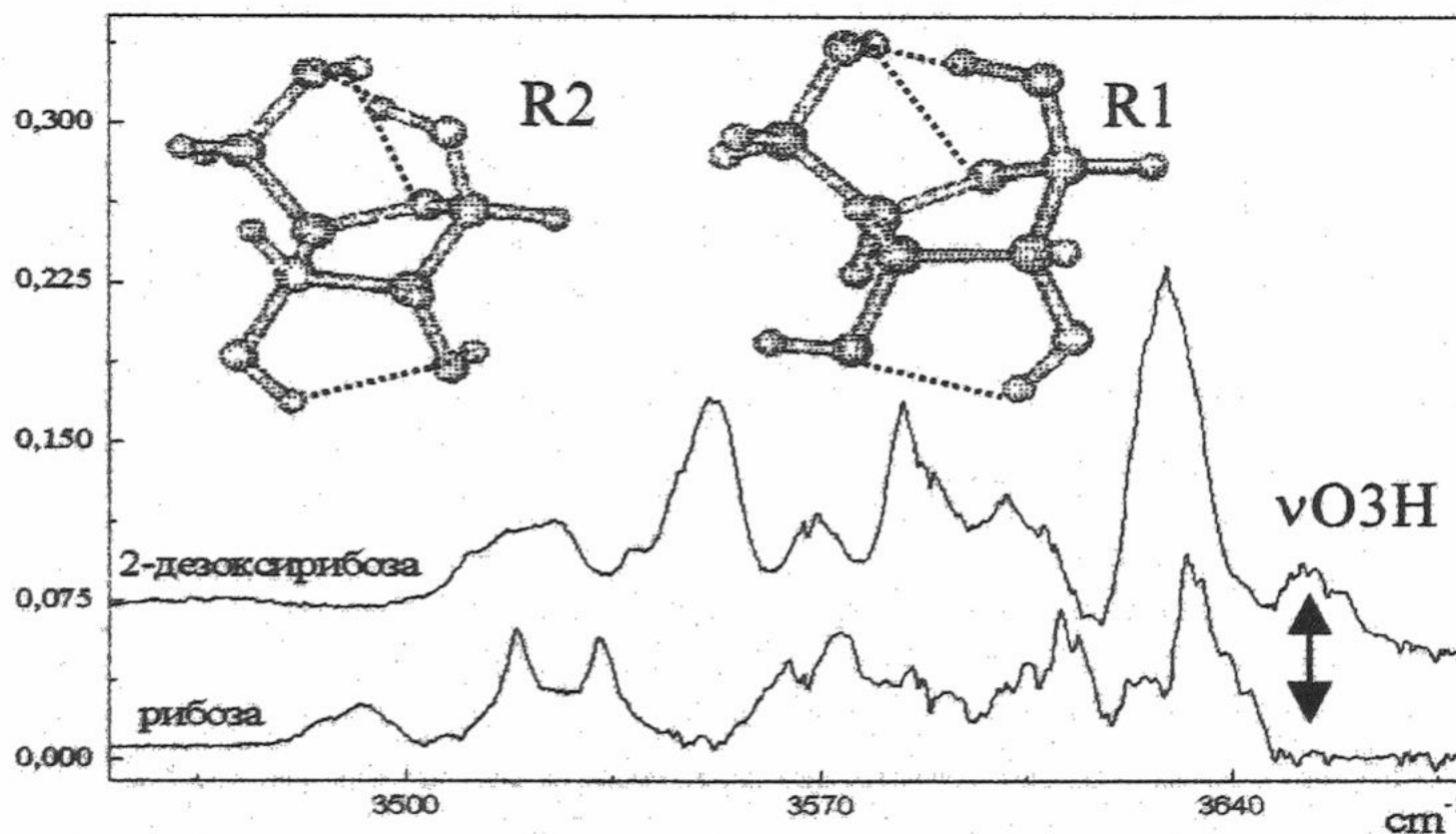


Рисунок. 4. Сравнение колебательных спектров рибозы и 2-дезоксирибозы в νOH области. (Аг матрицы, $T=12\text{ K}$, $M/S=900$).

на 10 см^{-1} по сравнению с мономером [25]. С учетом всего вышесказанного, в конформациях β1a и β2a 2-дезоксирибозы, где группа O5H является акцептором протона, ее частота должна на несколько см^{-1} превышать частоту $\nu\text{O5H}=3668\text{ см}^{-1}$ в нуклеотидах [8,9]. Отметим, что это хорошо согласуется с частотой

νOH метанола (3678.9 см^{-1}) в Ar матрице [25]. Из данных таблицы 1 следует, что спектральные полосы с частотами выше 3654 см^{-1} отсутствует в спектре, что позволяет сразу исключить из рассмотрения конформеры $\beta 1a$ и $\beta 2a$ (Рис. 2). Наши расчеты показывают, что частоты акцепторных групп O5H , O3H и свободной группы O1H находятся в одном спектральном диапазоне, превышающем 3672 см^{-1} , и практически совпадают (Таб. 3). Полное совпадение частот акцепторных групп O5H и O3H в урдине и цитидине также демонстрируют DFT расчеты методом B3LYP//6_31G(d) [3]. Поэтому можно считать, что конформационные изомеры $\beta 4$ и $\beta 4a$, $\beta 5$ и $\alpha 2$ полностью отсутствуют в низкотемпературных матричных образцах.

Вышесказанное дает основание говорить о фиксации в матричных образцах трех конформационных изомеров 2-дезоксирибозы - $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$. Согласно корреляции между частотным сдвигом и силой водородной связи [26], наиболее сильными водородными связями являются $\text{O1H} \dots \text{O5}$ в конформере $\beta 1$ и $\text{O5H} \dots \text{O1}$ в $\beta 2$. Сравнение полос колебаний νO1H конформеров $\beta 1$ и $\beta 1a$ (Таб. 3) показывает заметное влияние конформации фуранозного кольца на величину частотного сдвига, что необходимо учитывать в дальнейших исследованиях. Некоторые проблемы вызывает отнесение полос колебаний $\nu\text{O1H} \dots \text{O4}$, $\nu\text{O5H} \dots \text{O4}$. Метод HF/3-21G(p) не совсем корректно определяет частоты водородно-связанных колебаний νOH , например, показывая превышение νO1H над νO3H на 20 см^{-1} ($\beta 3$, Таб. 3). Переход к большему базису 6_31G(d,p) уменьшает эту разницу до 10 см^{-1} , поэтому дальнейшее увеличение базиса и использование методов MP2 и DFT представляется необходимым. Однако в целом, метод HF/3-21G(p) дает качественно верные результаты расчета интенсивностей колебательных полос, предсказывая увеличение интенсивности для более сильных водородных связей (Таб. 3). Точные оценки абсолютных интенсивностей водородно-связанных колебаний и заселенностей конформеров не позволило получить отсутствие четких данных о сдвиге конформационного равновесия под действием температуры испарения. Сдвига конформационного равновесия не вызывало также УФ-облучение матричных образцов в диапазоне 200-240 нм по методике аналогичной [20]. Однако отжиг матриц позволил, на основании уравнения Эйринга и экспериментальных данных работы [6], оценить нижнюю границу высот барьеров между конформерами в 2.5 ккал/моль .

В молекулах рибозы появляется возможность внутримолекулярных водородных связей $\text{O3H} \dots \text{O2}$ и $\text{O2H} \dots \text{O3}$ [1-4]. На данном этапе, мы не проводили детальных расчетов стабильности основных конформеров рибозы. Однако экспериментальный спектр (Рис. 4) позволяет сделать однозначный вывод об отсутствии в матричных образцах конформеров, имеющих свободные или чисто акцепторные OH группы, например, такие как в конформации $\tau 1$ (Рис. 4). По-видимому, в матрицах присутствует набор конформеров рибозы с расположением групп O3H и O2H аналогичным конформации $\tau 2$ (Рис. 4). Расположение остальных OH групп может соответствовать конформерам $\beta 1$ - $\beta 3$ (Рис. 2).

ВЫВОДЫ

Показано, что в изолированном состоянии молекулы 2-дезоксирибозы и рибозы находятся в кольцевой форме и обладают большой конформационной подвижностью. Проведенные квантово-химические расчеты продемонстрировали стабильность 14 конформационных изомеров 2-дезоксирибозы, стабилизированных внутримолекулярными водородными связями. Наиболее сильные внутримолекулярные водородные связи образованы группами O5H и O1H .

Путем сравнения экспериментальных и расчетных спектров определены три конформера 2-дезоксирибозы, фиксируемые в низкотемпературных матрицах при температурах 5-30К. Для них получена экспериментальная оценка нижней границы высот барьеров конформационных переходов превышающая 2.5 ккал/моль .

Установлено, что в матричных образцах отсутствуют конформеры рибозы и 2-дезоксирибозы, имеющие свободные или чисто акцепторные OH группы,

Литература:

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / Москва, Мир, 1987, 584 стр.
2. G.A. Jeffrey, W.Saenger Hydrogen Bonding in Biological Structures / Springer-Verlag, Berlin 1991 p. 563
3. N. Leulliot, M. Ghomi, G. Scalmani, G. Berthier, // J. Phys. Chem. A 1999, V.103, p. 8716-8724.
4. N. Leulliot, M. Ghomi, H. Jobic, O. Bouloussa, V. Baumruk, C.Coulombeau // J.Phys.Chem. B 1999, 103, p.10934-10944.
5. Говорун Д.М., Мишук Я.Р., Кондратюк І.В., Желтовський М.В // Доповіді НАН України, 8, 1996, стор. 141-144
6. Barnes A.J., // J.Mol. Struct. 113, (1984), p.161-174
7. В.П. Панов, Р.Г. Жбанков "Внутри и межмолекулярные взаимодействия в углеводородах" Минск "Наука и Техника" 1988.

8. S.A. Krasnokuski, A.Yu. Ivanov, V. Izvekov, G.G. Sheina, Yu.P. Blagoi J.Mol.Struct. 482-483, (1998), p. 249-252.
9. S.A.Krasnokutski, A.Yu.Ivanov, G.G.Sheina, Yu.P.Blagoi // 8th Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Netherlands 1999, p. 263.
10. А.Э. Кистер, В.Г. Дашевский и А.И. Китайгородский // Мол. Биол. Т.5., №.2 (1971) стр. 232-237.
11. Levitt M., Warshel A. // J. Amer. Chem. Soc. V. 100, p. 2607-2613, 1978.
12. Ning Lio, Arkadi Litvin and Roman Osman // J.Phys. Chem. A 1999, 103, p. 592-600
13. K.B. Borisenko, S. Samdal, I.F. Shishkov, L.V. Vil'kov J.Mol.Struct. 448 (1998) 29-41.
14. C.J.Cramer // J. Org. Chem. 1992, 57, p.7034-7043.
15. Bouke P. van Eijck, Rob W.W. Hooft, and Jan Kroon // J. Phys. Chem. V.97, p. 12093-12099, 1993.
16. Wladkowski B.D., Chenoweth S.A., Jones K.E., Brown J.W. // J. Phys. Chem. A 1998 V.102, p. 5086-5092.
17. S.E. Barrows, F.J. Dulles, C.J. Cramer, A.D. French, D.G. Truhlar Carb. Res. 276 (1995) 219.
18. A.Chang-Phillips, Y.Y. Chen // J.Phys.Chem. A 1999, 103, 953-964.
19. A.Yu.Ivanov, A.M. Plokhotnichenko, E.D. Radchenko, G.G. Sheina, Yu.P. Blagoi, J.Mol.Struct. 372 (1995) 91.
20. Yu. Ivanov, A.M. Plokhotnichenko, V. Izvekov, G.G. Sheina, Yu.P. Blagoi J.Mol.Struct. 408-409, 459 (1997).
21. M.W.Schmidt, K.K.Baldrige, J.A.Boats, S.T.Elbert, M.S.Gordon, J.H.Jensen, S.Koseki, N.Matsunaga, S.Su, T.L.Windus, M.Dupuis and J.A.Montgomeri. // J. of Computational Chemistry, Vol.14, No.11, (1993) p. 1347-1363
- 22 <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>
23. Altona C., Sundaralingam M. J. Amer. Chem. Soc. V. 94, p. 8205-8212, 1972.
24. B.Cadioli, E.Gallinella, C.Coulombeau, H Jobic, G.Berthier // J.Phys. Chem. V.97 (1993) p. 7844-7856.
25. S. Coussan, Y. Bouteiller, A.Loutellier, J.P. Perchard, S. Racine, A. Peremans, W.Q.Zheng, A. Tadjeddine, // Chem. Phys. 219, 1997, pp. 221-234
26. Водородная связь. Под ред. Соколова Н.Д. / М., Наука, 1981, стр. 288

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.323.23'336

ВЗАЄМОДІЯ КАРМІНОМІЦИНУ З ПОЛІ (А) ТА ПОЛІ (У)
ЗА ДАНИМИ ПОЛЯРИЗОВАНОЇ ФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ

Н.М. Жигалова, В.М. Зозуля*, О.О. Рязанова*

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, 61077, Харків, пл. Свободи, 4,

*Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,

61164, Харків, пр. Леніна, 47, E-mail: zozulya@ilt.kharkov.ua

Надійшло до редакції 12 травня 2000 р.

Методами абсорбційної та поляризованої флюоресцентної спектроскопії вивчено взаємодію антрациклінового антибіотику карміноміцину з синтетичними полінуклеотидами: полі (А) і полі (У) при низькій іонній силі розчину. Встановлено, що цей барвник з одноланцюговими полінуклеотидами утворює два альтернативних типи комплексів, формування яких відбувається за рахунок електростатичної взаємодії аміноцукору ліганду з фосфатними групами полімеру. При малих співвідношеннях молярних концентрацій полімеру та ліганду (P/D) домінує кооперативне зв'язування зі стекінг-асоціатами хромофорів карміноміцину між собою. При високих значеннях P/D асоціати розпадаються і утворюються комплекси мономерів ліганду з нуклеїновими основами. Оцінені термодинамічні параметри двох типів взаємодії карміноміцину з полінуклеотидами: з нуклеїновими основами та з фосфатними групами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карміноміцин, полінуклеотиди, комплексоутворення, поляризована флюоресценція.

Відомо, що взаємодія ряду біологічно активних сполук, які мають плоску гетероциклічну структуру (барвники, антибіотики, канцерогени, фотосенсибілізатори та деякі інші) з нуклеїновими кислотами відбувається шляхом інтеркаляції їх хромофорів у подвійну спіраль, що порушує передачу спадкової інформації та призводить до загибелі клітини. Таким чином, наприклад, діють протипухлинні антрациклінові антибіотики. Крім інтеркаляції катіонні молекули можуть електростатично взаємодіяти з поліаніонною матрицею, яку утворюють фосфатні групи нуклеїнових кислот. За звичаєм увага приділяється сильному - інтеркаляційному типу взаємодії, а слабим типом зовнішнього зв'язування традиційно нехтують. Але при зв'язуванні катіонних інтеркаляторів з одноланцюговими нуклеїновими кислотами, у яких немає спарених основ і фосфатні групи легко доступні, цей тип може бути домінуючим. Комплексоутворення антрациклінів з односпіральними полінуклеотидами не вивчено.

В даній роботі досліджено взаємодію антрациклінового антибіотику карміноміцину (КМ) (рис. 1) з синтетичними гомополінуклеотидами полі (А) та полі (У). Конформаційні властивості цих полінуклеотидів дозволяють моделювати різні структурні матриці для зв'язування інтеркаляторів. Полі (А) в залежності від рН може бути в одно- та дволанцюговому стані, а полі (У) – одониткова молекула з розупорядкованими основами.

Дослідження проводили методами флюоресцентної і абсорбційної спектроскопії. При цьому використовувалась поляризаційна флюоресцентна фотометрія, яка є ефективним засобом вивчення міжмолекулярних взаємодій ароматичних сполук, тому що інтенсивність флюоресценції ліганду дуже чутлива до зміни довкілля його хромофору, а поляризація відбиває ступінь рухомості хромофору, яка завжди зменшується при комплексоутворенні [1]. Отримані експериментальні дані дозволили запропонувати моделі зв'язування КМ з одно- та дволанцюговими матрицями і оцінити кількісні співвідношення двох типів взаємодії КМ з полінуклеотидами: з нуклеїновими основами та з фосфатними групами.

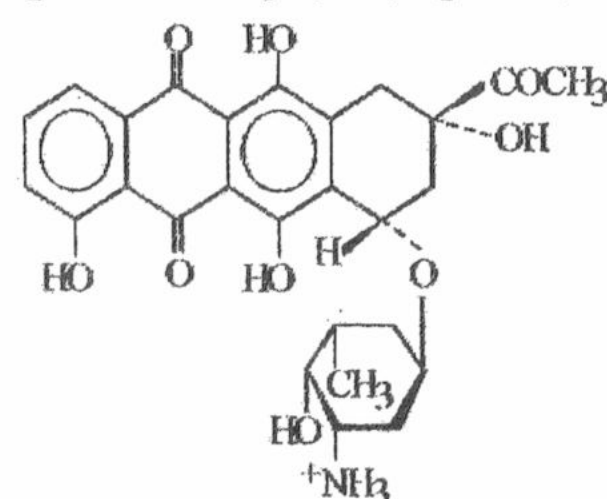


Рис.1. Структурна формула карміноміцину

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використовували гідрохлорид КМ виробництва НДІ антибіотиків (Москва, Росія), інші реактиви були виробництва Sigma (Німеччина). Концентрацію карміноміцину та полінуклеотидів визначали спектрофотометрично. Коефіцієнти молярної екстинкції: для КМ $\epsilon_{492} = 14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [2], для полі (А) $\epsilon_{257} = 10100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і для полі (У) $\epsilon_{260} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [3]. Розчинником був 1 мМ Na-какоділатний буфер з 0,5 М Na_2EDTA , який готували на деіонізованій дистильованій воді. В експериментах з одонитковими полінуклеотидами використовували рН 7, а з двонитковою полі (А) - рН 4.9. Зміна відношення молярних концентрацій полінуклеотидів і ліганду, P/D , досягалася титруванням

Взаємодія карміноміцину з полі(А) та полі(У) ...

розчинів КМ ($1,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) безпосередньо в кюветі розчином полімеру. Вимірювання проводили в кварцових кюветах при температурі $22-24^\circ \text{C}$.

Флюоресценція КМ збуджувалась при $\lambda = 441,6 \text{ нм}$ стабілізованим поляризованим випромінюванням гелій-кадмієвого лазера ЛПМ-11. Параметри флюоресценції вимірювали в максимумі смуги флюоресценції КМ при 584 нм за методом рахування фотонів [4]. Похибка виміру інтенсивності флюоресценції не перевищувала $0,5\%$. Загальну інтенсивність, I , ступінь поляризації, ρ , і анізотропію, μ , флюоресценції визначали за формулами:

$$I = I_{\parallel} + 2I_{\perp}, \quad \rho = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}), \quad \mu = 2\rho / (3 - \rho) \quad (1),$$

де $I_{\parallel}$, $I_{\perp}$ - інтенсивність флюоресценції з електричним вектором паралельним та перпендикулярним вектору збуджувального проміню.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 2 і 3 наведені залежності відносної оптичної густини A/A_0 , відносної інтенсивності I/I_0 та поляризації ρ флюоресценції від P/D при титрування КМ полі (А) та полі (У). A_0 , I_0 - параметри для вільного барвника.

Форми кривих титрування свідчать про формування комплексів КМ двох типів з одонитковими полімерами. При малих співвідношеннях P/D (до $P/D \approx 2$) спостерігалось гасіння флюоресценції (рис. 2b, 3b), яке є повним оскільки поляризація флюоресценції (рис. 2c, 3c) залишається такою ж, як і для вільного барвника, що вказує на світіння тільки незв'язаних молекул. Оптична густина при цьому зменшується (рис. 2a, 3a). Подібні зміни спектроскопічних властивостей КМ спостерігалися при його зв'язуванні з моделлю поліаніону - поліфосфатом і характеризували стекінг-взаємодію хромофорів при утворенні димерів [2]. Таким чином при низьких P/D молекули КМ зв'язуються з полінуклеотидами за рахунок електростатичного притягання аміноцукору до фосфатів, а хромофори ліганду асоціюють між собою.

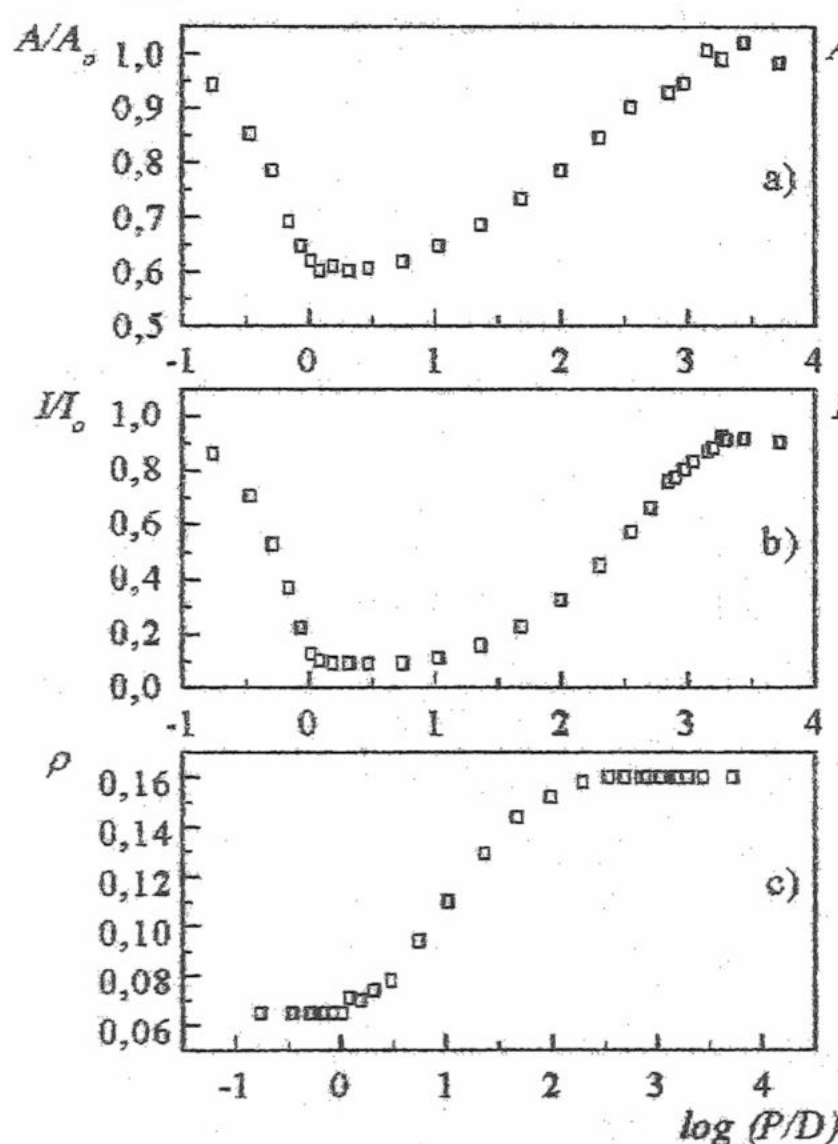


Рис. 2. Зміни оптичної густини - а), інтенсивності - б), поляризації - с), флюоресценції КМ при зв'язуванні з полі (У) - □, рН 7.

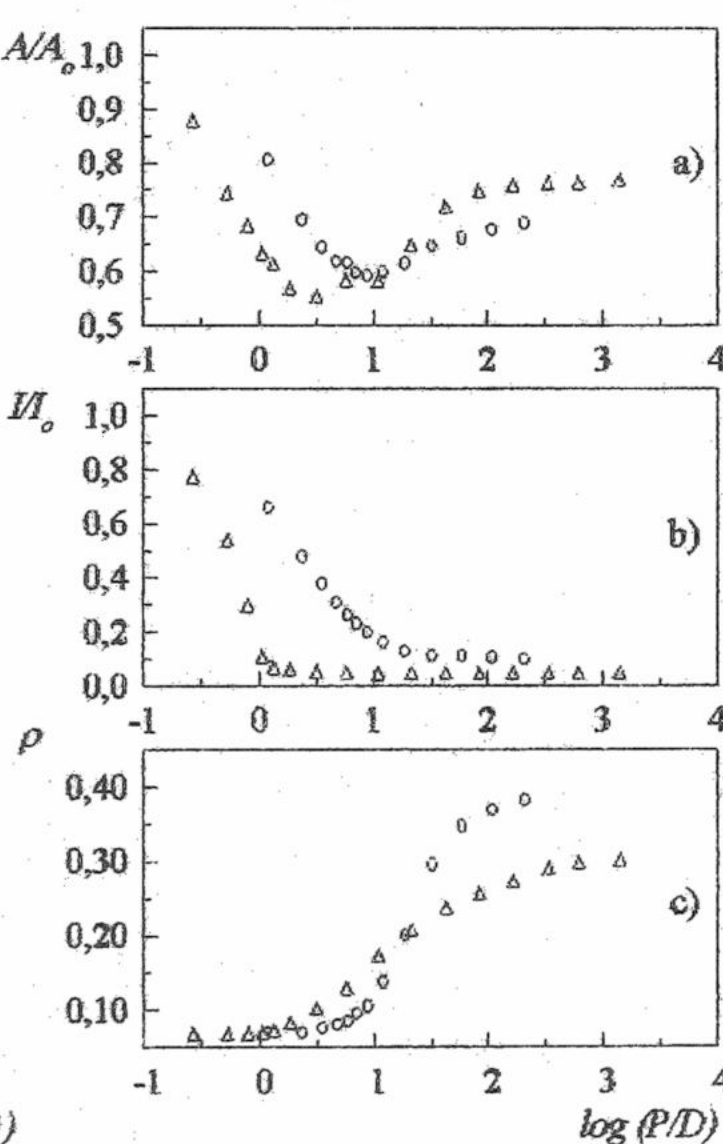


Рис. 3. Зміни оптичної густини - а), інтенсивності - б), поляризації - с) флюоресценції КМ при зв'язуванні з полі (А): Δ - рН 7; ○ - рН 4,9.

Поява високополяризованої флюоресценції з ростом P/D свідчить про комплексоутворення з нуклеотидними основами, причому це відбувається внаслідок поступового розпаду асоціатів КМ на мономери, аміногрупи яких напевно лишаються електростатично зв'язаними з фосфатами біополімеру. При дуже великих P/D оптичні характеристики набувають значення, які характеризують взаємодію барвника лише у комплексах з нуклеотидними основами. Про наявність такої взаємодії свідчать висока ступінь поляризації флюоресценції, а також довгохвильовий зсув максимуму смуги поглинання КМ на 3 нм при зв'язуванні

з полі (У) та на 10 нм - з полі (А). Зв'язування КМ з урацилами не змінює інтенсивності флюоресценції і поглинання, але ж для комплексів з аденінами спостерігаються гіпохромізм поглинання і сильне гасіння флюоресценції. Механізм гасіння флюоресценції КМ аденіном обґрунтовано в роботі [5].

Для порівняльного аналізу досліджували взаємодію КМ з полі (А) при рН 4,9, коли цей полінуклеотид утворює двониткову спіраль. Як видно з рис. 3, аденін і в такій структурі викликає гасіння флюоресценції КМ. Зростання поляризації флюоресценції, гіпохромізм і "червоний" зсув на 13 нм смуги поглинання свідчать про переважно інтеркаляційний механізм зв'язування. Характер залежності інтенсивності флюоресценції від P/D такий же, що спостерігався нами для нативної ДНК [4].

Спектроскопічні характеристики КМ, зв'язаного з нуклеотидними основами, були отримані як граничні значення залежностей вимірюваних величин від D/P і наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Спектроскопічні характеристики карміноміцину в комплексах з полінуклеотидами

Препарат	A/A_0	I/I_0	ρ
КМ	1,00	1,00	0,065
КМ+полі (U)	1,00	0,90	0,160
КМ+полі (A) одноланцюгова	0,77	0,04	0,300
КМ+полі (A) дволанцюгова	0,70	0,10	0,380

Рухомість ланок полінуклеотиду, з якими зв'язаний барвник, визначає поляризацію флюоресценції. Як видно з таблиці 1, для найбільш лабільного ланцюга полі (U) вона найменша, 0,16, а для жорсткої подвійної структури полі (A) - найбільша, 0,38.

Кількісні характеристики комплексоутворення були отримані з аналізу ізоTERM зв'язування, побудованих в координатах Скотчарда (рис. 4), де $r = \gamma_{\text{зв}} D/P$ - кількість зв'язаних молекул КМ на один нуклеотид, а $C = (1 - \gamma_{\text{зв}}) D = \gamma_0 D$ - концентрація вільного КМ. Частку зв'язаного КМ, $\gamma_{\text{зв}}$, розраховували за рівнянням Елдертона і Айзенберга [6]:

$$\gamma_{\text{зв}} = I/I_0 * [(\mu - \mu_{\text{зв}}) / (\mu_0 - \mu_{\text{зв}})] \quad (2)$$

Опуклість кривих Скотчарда для одноланцюгових полінуклеотидів (рис. 4а) свідчить про те, що електростатична взаємодія зі стекинг-асоціацією хромофорів КМ є сильним кооперативним процесом.

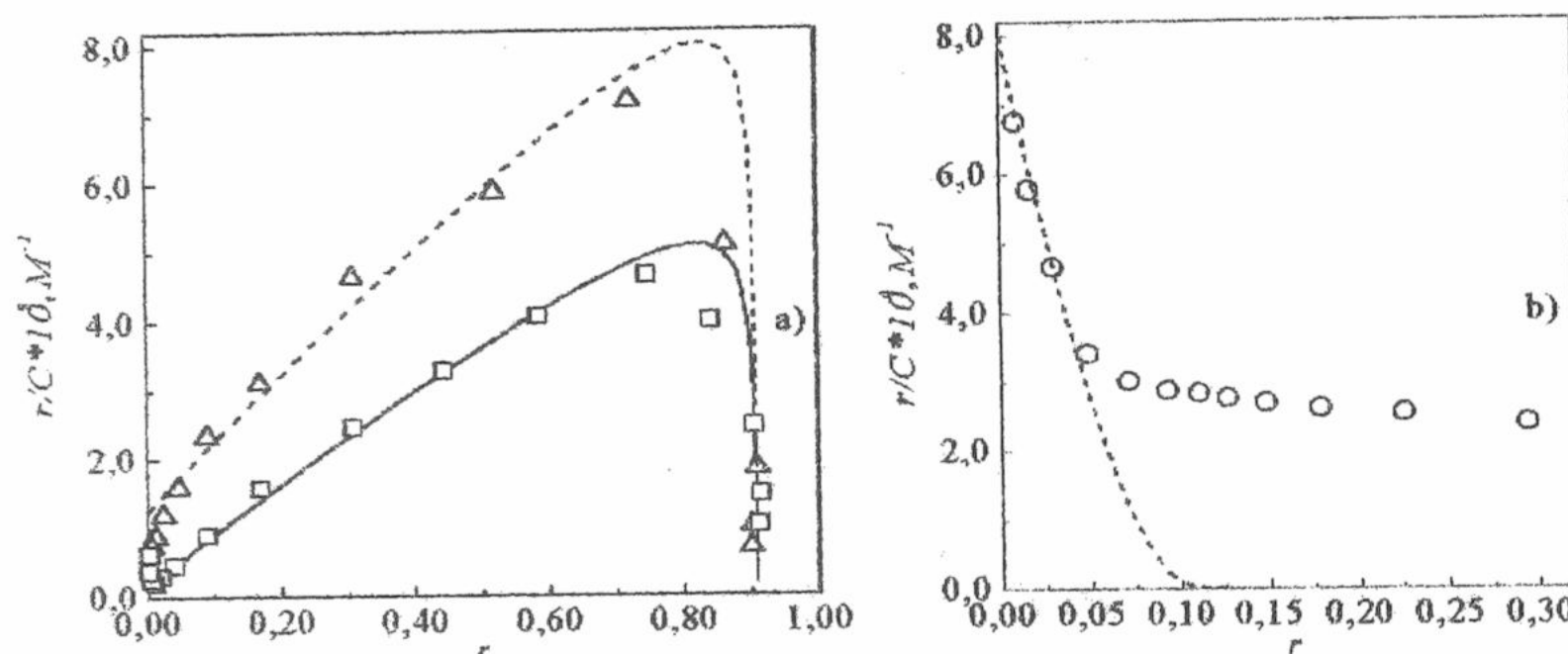


Рис. 4. Ізотерми адсорбції КМ на: а) - одностанкових полі (U) - □ і полі (A) - Δ; б) - двостанковій полі (A) - ○. Суцільною та пунктирною лініями наведена апроксимація експериментальних даних рівняннями (5) та (6).

Його константу і розмір місць зв'язування можна визначити за методом Шварца [7]. Для цього аналізують зміну частки вільного ліганду, γ_0 , при малих P/D . Таку залежність у нас відбивають початкові ділянки кривих флюоресцентного титрування (рис. 5), тому що $I/I_0 = \gamma_0$, внаслідок повного гасіння зв'язаного КМ.

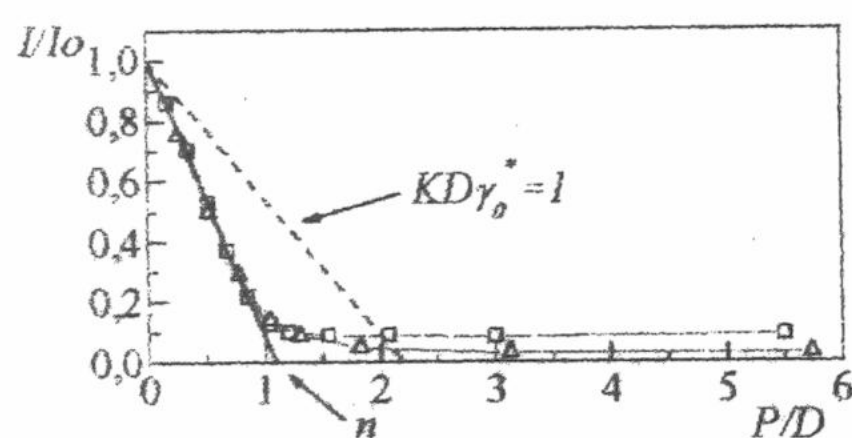


Рис. 5. Флюоресцентне титрування КМ полі (U) - □ і полі (A) - Δ, рН 7. Суцільна та пунктирна лінії - визначення параметрів зв'язування за методом Шварца

титрування були одержані такі значення γ_0^* : для полі (U) - 0,09 та полі (A) - 0,05. Підставив ці дані та відомі концен-трації КМ, отримали величини констант K : для полі (U) - $6,5 \cdot 10^5 M^{-1}$ і для полі (A) - $1,16 \cdot 10^6 M^{-1}$, константою кооперативної взаємодії:

$$K = K_1 \cdot \omega, \quad (4)$$

де K_1 - константа мономерного зв'язування, ω - параметр кооперативності.

Взаємодія карміноміцину з полі(А) та полі(У) ...

Експериментальні дані в координатах Скетчарда були апроксимовані рівнянням Мак Гі і фон Хіппела [8], яке враховує два типи зв'язування з однією решіткою. Один з них - кооперативна стекінг-асоціація КМ, а другий - некооперативне зв'язування з нуклеїновими основами:

$$r/C = (1 - nr) \left[K_2 + K_1 \left[\frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right]^{(n-1)} \left[\frac{1 - (n+1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2 \right] \quad (5)$$

$$R = \left[[1 - (n+1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr) \right]^{1/2}$$

Взаємодію з нуклеїновими основами характеризує константа K_2 . Розмір місць зв'язування прийнятий однаковим для обох типів комплексів і визначений вище, $n=1,1$. Точки перетинання експериментальних залежностей Скетчарда з віссю r/C при $r=0$ (рис. 4а) визначають суму мономерних констант K_1+K_2 , яка дорівнює 10^4 M^{-1} для комплексів КМ з полі (У) і $1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ - з полі (А). Для K_1 ми прийняли значення константи мономерного електростатичного зв'язування КМ, яке отримано в системі з поліфосфатом [2]: $K_1=1,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. K_2 легко визначається з суми констант: $8,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ для полі (У) і $1,18 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для полі (А). Невідомим параметром залишається тільки ω , який був отриманий з найкращої апроксимації і дорівнює для комплексів КМ з полі (У) - 360, а для полі (А) - 600. Звідси константи кооперативного зв'язування КМ за рівнянням (4) будуть для системи з полі (У) - $6,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, а для полі (А) - $1,08 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, які добре співпадають з величинами, отриманими за методом Шварца.

Як бачимо, параметри зв'язування КМ з дослідженими полінуклеотидами відрізняється для обох типів взаємодії. Параметр кооперативності більший для полі (А), тому що лінійна густина негативних зарядів для неї вища. Також константа взаємодії з основами поліаденілату значно більша, ніж з основами полі (У). Це пояснюється частково упорядкованою вторинною структурою полі (А), тоді як основи в полі (У) повністю розупорядковані.

Для зв'язування КМ з двонитковою полі (А) крива Скетчарда (рис. 4б) також свідчить про наявність двох типів взаємодії, з яких переважає інтеркаляційний механізм. Крута ділянка ізотерми, яка відповідає інтеркаляції, може бути добре описана рівнянням Мак Гі та фон Хіппела у разі некооперативного зв'язування:

$$r/C = K(1 - nr) \cdot \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} \quad (6)$$

з параметрами: $n=8$, $K=8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Друга ділянка ізотерми відповідає слабому типу електростатичного зв'язування з зовнішньою поверхнею полінуклеотиду. Подібний характер спостерігали для зв'язування КМ з нативною ДНК [4].

ВИСНОВКИ

Кооперативне електростатичне зв'язування відіграє важливу роль при взаємодії КМ з одноланцюговими нуклеїновими кислотами. Зв'язування КМ з основами одноланцюгових полінуклеотидів можливо лише при умові електростатичної взаємодії аміноцукору з фосфатними групами полімеру. При взаємодії КМ з двонитковою полі (А) переважає інтеркаляційна взаємодія, а електростатична менш суттєва.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лакович Дж. Основы флюоресцентной спектроскопии. - М.: Мир, 1986. - 492 с.
2. Zozulya V.N., Fyodorov V.F., Blagoi Yu.P. Cooperative binding of daunomycin and carminomycin to inorganic polyphosphate // *Studia biophysica*. - 1990. - V. 137, № 1-2. - P. 17-28.
3. Зозуля В.Н., Волошин И.М., Федоров В.Ф., Благоев Ю.П. Взаимодействие акрихина с одноцепочечными полинуклеотидами по данным лазерной поляризованой флюоресценции // *Биополимеры и клетка*. - 1992. - Т.8, № 1. - С. 73-78.
4. Зозуля В.Н., Жигалова Н.Н., Федоров В.Ф., Благоев Ю.П. Взаимодействие карминомицина с ДНК по данным лазерной поляризованой флюоресценции // *Молек. биол.* - 1989. - Т.23, вып.2. - С.605-611.
5. Zozulya V. Fluorescence properties of intercalating neutral chromophores in complexes with polynucleotides of various base compositions and secondary structures // *J. Fluorescence*. - 1999. - V. 9, № 4. - P. 363-366.
6. Ellerton N.F., Isenberg I. Fluorescence polarization study of DNA-proflavine complexes // *Biopolymers*. - 1969. - V.8. - P.767-786.
7. Schwarz G. Cooperative binding to linear biopolymers. 1. Fundamental static and dynamic properties // *Eur. J. Biochem.* - 1970. - V.12. - 442-453.
8. McGhee J.D., von Hippel P.H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.* - 1974. - V.86. - P. 469-489.

УДК 577.3

АНАЛИЗ СИММЕТРИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА И СТЕПЕНЬ ДЕТЕРМИНАЦИИ КОДОНОВ

Д. Р. Дуплий, С. А. Дуплий

Харьковский национальный университет им. М. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61077, Украина

E-mail: Steven.A.Duplij@univer.kharkov.ua. Internet: <http://gluon.physik.uni-kl.de/~duplij>

Поступила в редакцию 20 июня 2000 г.

Предлагается трехмерная модель генетического словаря в терминах введенной числовой характеристики нуклеотидов — степени детерминации, которая отражает абсолютную разность содержания пиримидиновых и пуриновых оснований в одной нити ДНК. В рамках этой модели прослеживаются выраженные симметричные закономерности и групповые свойства, которые описаны. Предлагается использовать степень детерминации для анализа генетических текстов а также предсказания структур и значения различных функциональных участков ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: генетический код, кодон, кубическая матрица, пурин-пиримидиновая инверсия, степень детерминации, симметрия, группа вращений

Понимание современных концепций молекулярной генетики невозможно без дальнейшего всестороннего изучения аппарата экспрессии генов [1, 2]. Весьма актуальным в этом направлении являются алгебраические подходы к проблеме эволюции эукариотического генетического кода [3, 4], заключающиеся в применении теоретико-групповых методов [5], поиске симметрий [6, 7] и суперсимметрий [8, 9, 10], техники векторных пространств [11]. Однако внутренняя структура генетического кода и топология ДНК требуют дальнейшего исследования [12, 13, 14].

В работе предлагается трехмерная модель генетического словаря, на основании разной степени детерминации нуклеотидов d , которая описывается количественно. Внутри полученной модели прослеживаются выраженные симметричные закономерности и групповые свойства. Введенная степень детерминации нуклеотида d отражает абсолютную разность содержания пиримидиновых и пуриновых оснований в наборах нуклеотидов и находится с ней в периодической зависимости. Обсуждается возможность использования этой числовой характеристики для анализа и чтения генетических текстов, а также предсказание строения различных функциональных участков ДНК.

ВЫРОЖДЕННОСТЬ КОДА И СПЕЦИФИЧНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ

Хорошо известно, что генетический код имеет триплетный характер с разной степенью специфичности оснований [15]. Так первые два основания кодона в большей степени детерминируют образование определенной аминокислоты, чем третье основание. Например, любая из аминокислот — глицин, валин, пролин, аланин и треонин — кодируется четырьмя кодонами, и в каждом случае эти четыре кодона различаются только нуклеотидами в третьей позиции. Другими словами 32 кодона, то есть половина всего количества, имеет полное вырождение по третьему основанию z . Аминокислота полностью задана первыми нуклеотидами x и y независимо от нуклеотида z . Для двукратно вырожденных кодонов характер аминокислоты определяется пуринами ($z = A, G$) или пиримидинами ($z = C, U$) находящимися в третьей позиции. Около двух третей общего количества оснований, присутствующих в ДНК имеют примерно постоянный характер у всех организмов — это основания, занимающие первое и второе положение в триплете, изменчивость состава ДНК определяется основаниями в третьем положении [16, 15].

Корреляция между количеством определенных аминокислот в белке и относительным содержанием гуанина и цитозина в соответствующей ДНК была найдена еще до окончательного выяснения генетического словаря [12]. Увеличение содержания $G + C$ в ДНК различно отражается на

составе аминокислот в белке и характеризуется следующими тремя зависимостями. Содержание одних аминокислот увеличивается при увеличении количества $G + C$ в ДНК, содержание других уменьшается, а содержание третьих остается индифферентным относительно количества цитозина и гуанина. В зависимости от содержания гуанина и цитозина дуплеты нуклеотидов, кодирующих аминокислоты разделяются на три класса: не включающие ни гуанин, ни цитозин; содержащие исключительно гуанин и цитозин и промежуточные [12]. Очевидно, что присутствие в кодоне гуанина или цитозина в большой степени детерминирует образование совершенно определенной аминокислоты, в то время как наличие аденина или урацила не является высоко специфичным: например, дуплет AA соответствует и Lys , и Asn , дуплет UU кодирует $Phen$ и Leu , в то время как CG всегда детерминирует Arg).

СТРУКТУРА МАТРИЦЫ ДУПЛЕТОВ

Поскольку основание в третьем положении допускает большую вариабельность для одной и той же аминокислоты, целесообразно рассмотреть первые два основания кодонов x, y отдельно от третьего z . При этом шестнадцать возможных дуплетов по способности детерминировать аминокислоту распадаются на два октета. Восемь дуплетов (более “сильных”) однозначно кодирующих аминокислоты независимо от третьего основания, и восемь (“слабых”), у которых третье основание определяет значение кодона. Дуплеты xu первого и второго октетов резко различаются по составу. В первом октете A встречается лишь один раз, во втором — один раз C . Причем, переход от дуплетов “сильного” октета в дуплеты “слабого” октета можно получить следующей заменой [17]

$$C \xleftrightarrow{*} A, G \xleftrightarrow{*} U, \quad (1)$$

которую мы будем обозначать “операция (*)” и называть пурин-пиримидиновой инверсией.

Четыре нуклеотида можно расположить по способности однозначно детерминировать аминокислоты в порядке убывания следующим образом [18]:

Пиримидин	Пурин	Пиримидин	Пурин	
C	G	U	A	(2)
очень сильная	сильная	слабая	очень слабая	

Эти нуклеотиды отличаются и по числу водородных связей, которые они могут образовывать с комплементарными нуклеотидами антикодона: каждая из сильных букв (C и G) образует по три водородные связи, в то время как каждая из слабых букв (U и A) образует лишь по две водородные связи [18, 19]. Можно предположить, что, чем больше водородных связей в дуплете, тем меньшее значение имеет взаимодействие $z \rightarrow z'$ третьего основания с антикодоном.

Для того, чтобы перейти от качественного описания структуры генетического кода (относительно способности кодировать аминокислоту) к количественному, введем числовую характеристику эмпирической “силы” — “степень детерминации” нуклеотида d . Исходя из (2) будем считать, что степень детерминации d может принимать значения от одного до четырех соответственно возрастанию этой силы. Если обозначить степень детерминации кодона верхним индексом в скобках, то четверку оснований (2) можно представить в виде вектора-столбца

$$V = \begin{pmatrix} C^{(4)} \\ G^{(3)} \\ U^{(2)} \\ A^{(1)} \end{pmatrix} \quad (3)$$

и соответствующей вектор-строки

$$V^T = (C^{(4)} \quad G^{(3)} \quad U^{(2)} \quad A^{(1)}). \quad (4)$$

Операция (*) (1) действует на вектор-столбец V следующим образом

$$V^* = \begin{pmatrix} A^{(1)} \\ U^{(2)} \\ G^{(3)} \\ C^{(4)} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Рассмотрим внешнее произведение [20] вектора-столбца (3) и вектора-строки (4)

$$\begin{aligned} M &= V \times V^T = \begin{pmatrix} C^{(4)} \\ G^{(3)} \\ U^{(2)} \\ A^{(1)} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C^{(4)} & G^{(3)} & U^{(2)} & A^{(1)} \end{pmatrix} = \\ &= \begin{pmatrix} C^{(4)}C^{(4)} & C^{(4)}G^{(3)} & C^{(4)}U^{(2)} & C^{(4)}A^{(1)} \\ G^{(3)}C^{(4)} & G^{(3)}G^{(3)} & G^{(3)}U^{(2)} & G^{(3)}A^{(1)} \\ U^{(2)}C^{(4)} & U^{(2)}G^{(3)} & U^{(2)}U^{(2)} & U^{(2)}A^{(1)} \\ A^{(1)}C^{(4)} & A^{(1)}G^{(3)} & A^{(1)}U^{(2)} & A^{(1)}A^{(1)} \end{pmatrix}. \end{aligned} \quad (6)$$

Отсюда видно, что M (6) представляет собой матрицу дуплетов, внутренняя структура которой определяется внешним произведением векторов. Именно этот факт обуславливает высокую степень симметрии матрицы M и позволяет исследовать свойства математической модели генетического словаря в терминах абстрактной теории групп.

СВОЙСТВА МАТРИЦЫ ДУПЛЕТОВ И СТЕПЕНИ ДЕТЕРМИНАЦИИ

Будем полагать, что в первом приближении степень детерминации кодона d является аддитивной характеристикой, то есть степень детерминации дуплета складывается из степеней детерминации составляющих его нуклеотидов (например, $d_{GA} = d_G + d_A$). Тогда из матрицы дуплетов M можно получить соответствующую (симметрическую) матрицу D степеней детерминации

$$D = \begin{pmatrix} 8 & 7 & 6 & 5 \\ 7 & 6 & 5 & 4 \\ 6 & 5 & 4 & 3 \\ 5 & 4 & 3 & 2 \end{pmatrix}, \quad (7)$$

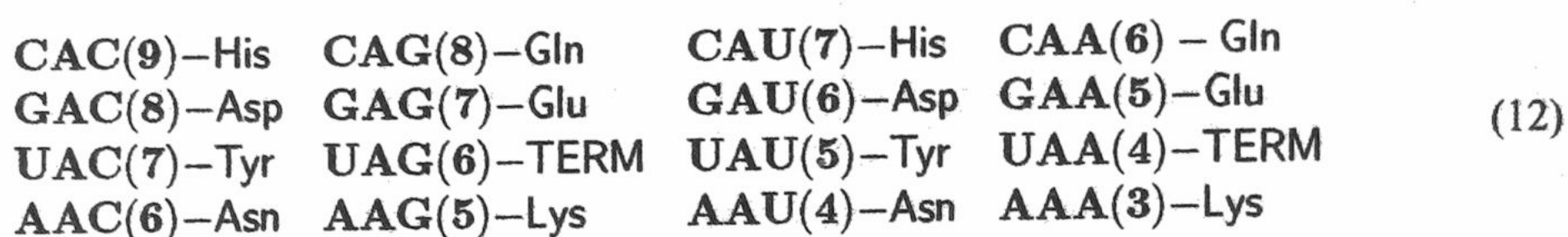
в которой явно прослеживаются симметричные закономерности. Отметим, что симметрия матрицы (7) настолько высока, что матрица сингулярна, т. е. ее детерминант равен нулю $\det D = 0$, и ранг матрицы равен двум $\text{rank } D = 2$, ее дефект также равен двум. Это является следствием того факта, что она есть внешнее произведение (6). Примечательно, что след матрицы равен $\text{tr } D = 20$ и совпадает с суммой элементов боковой диагонали. Видно также, что по боковой диагонали матрицы (7) и параллельно ей находятся "равносильные" дуплеты. Операция (*) (1) соответствует отражению матрицы степеней детерминации (7) относительно боковой диагонали

$$D^* = \begin{pmatrix} 2 & 3 & 4 & 5 \\ 3 & 4 & 5 & 6 \\ 4 & 5 & 6 & 7 \\ 5 & 6 & 7 & 8 \end{pmatrix}. \quad (8)$$

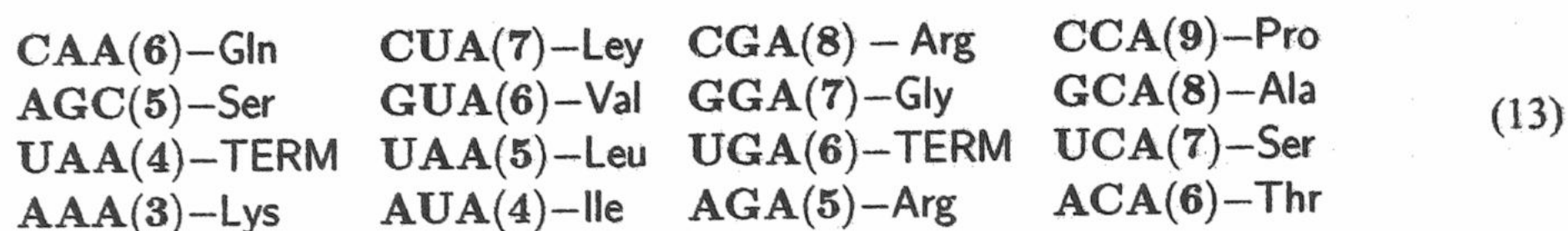
и, следовательно, пурин-пиримидиновая инверсия не меняет основных свойств матрицы D , то есть имеем $\det D^* = \det D = 0$, $\text{rank } D^* = \text{rank } D = 2$ и $\text{tr } D^* = \text{tr } D = 20$.

Если расположить боковую диагональ матрицы M горизонтально, то мы получаем ромбическую структуру дуплетов

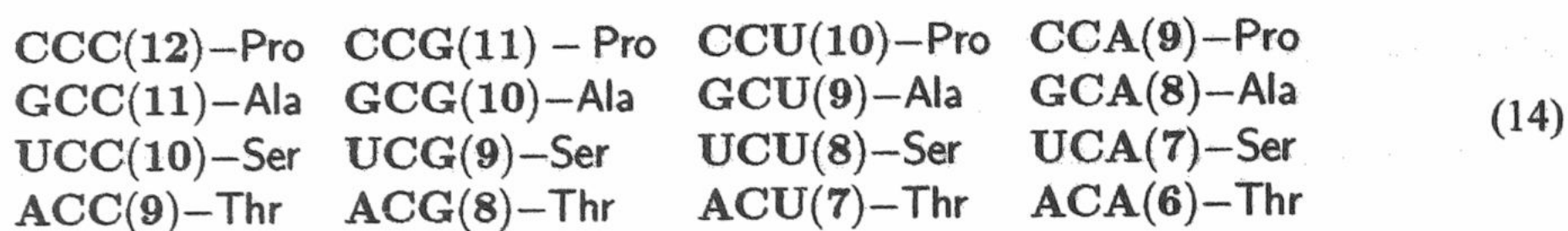
ААС(6). Грани, имеющие общее ребро САА— ААА



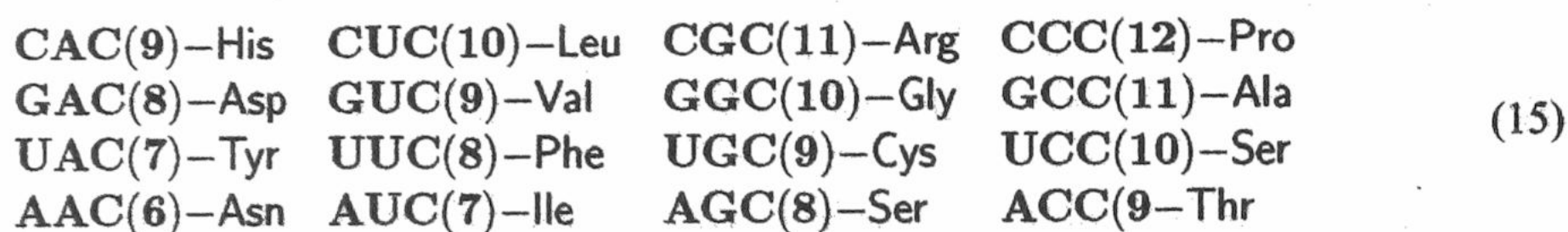
и



имеют силу, равную 96, а грани с общим ребром CCC— ACC



и



имеют силу, равную 144. Следовательно, грани имеющие общую точку ААА(3) характеризуются силой 96, а грани, пересекающиеся в точке максимального полюса CCC(12), имеют силу 144 каждая. Это подтверждает высокую симметрию кубической матрицы К.

Внутренние плоскости матрицы, параллельные граням, число которых шесть, как и наружных, по сумме сил разделяются на две группы: с силами 112 и 128. Две вертикальные плоскости [CAU(7), CCU(10), ACU(7), AAU(4)] и [CUC(10), CUA(7), AUA(4), AUC(7)], линия пересечения которых проходит через CUU(8)— AUU(5), а также плоскость [UAC(7), UCC(10), UCA(7), UAA(4)], пересекающая две первые и имеющая с ними общую точку UUU(6) имеют силу 112 каждая и находятся ближе к минимальному полюсу. Плоскости [CGC(11), CGA(8), AGA(5), AGC(8)] и [CAC(8), CCG(11), ACG(8), AAC(5)] пересекаются по следующей прямой CGG(10)— AGG(7) и имеют с плоскостью [GAC(8), GCC(11), GCA(8), GAA(5)] общую точку GGG(9). Сила каждой из них равна 128. Отметим что, точками пересечения равносильных плоскостей являются монотонные тринуклеотиды, находящиеся на главной диагонали. Отсюда следует правило:

Сила грани или плоскости, параллельной грани, d_{plane} однозначно определяется ее единственным монотонным тринуклеотидом ААА(3), UUU(6), GGG(9), CCC(12) и равна 96, 112, 128. 144 соответственно.

Важно, что график зависимости силы плоскости d_{plane} от силы принадлежащего ей монотонного тринуклеотида d_{mono} представляет собой прямую линию

$$d_{plane} = \frac{16}{3}d_{mono} + 80, \quad (16)$$

что является следствием высокой симметрии кубической матрицы.

КУБИЧЕСКАЯ МАТРИЦА КОДОНОВ И ВЫРОЖДЕННОСТЬ КОДА

Рассмотрим особенности расположения кодонов и их значений в построенной кубической матрице К. Поскольку каждому кодону, кроме трех терминальных, соответствует аминокислота, то можно говорить о трехмерной модели генетического словаря.

Отметим следующие свойства этой модели. Гидрофобные аминокислоты Leu, Val, Phe, Ile лежат в одной плоскости CUC(10), CUA(7), AUA(4), AUC(7). Оксимоноаминокарбоновые кислоты серин (Ser) и треонин (Thr) находятся на наружной грани CCC(12), CCA(9), ACA(6), ACC(9). На верхней грани куба находятся четыре из шести кодонов лейцина и аргинина, и все кодоны этой грани содержат цитозин. Кодоны пролина занимают строку с наибольшими степенями детерминации CCC(12), CCG(11), CCU(10), CCA(9). Аминокислоты, кодирующиеся четырьмя кодонами, расположены в строку, причем моноаминокарбоновые аминокислоты лежат в одной плоскости

$$\begin{array}{cccc}
 \text{GCC(11)–Ala} & \text{GCG(10)–Ala} & \text{GCU(9)–Ala} & \text{GCA(8)–Ala} \\
 \text{GGC(10)–Gly} & \text{GGG(9)–Gly} & \text{GGU(8)–Gly} & \text{GGA(7)–Gly} \\
 \text{GUC(9)–Val} & \text{GUG(8)–Val} & \text{GUU(7)–Val} & \text{GUA(6)–Val} \\
 \text{GAC(8)–Asp} & \text{GAG(7)–Glu} & \text{GAU(6)–Asp} & \text{GAA(5)–Glu}
 \end{array} \quad (17)$$

Последнюю строку занимают моноаминодикарбоновые аминокислоты: аспарагиновая и глутаминовая, обладающие гидрофильными свойствами. Уникальные кодоны AUG(6)–Met находится в плоскости нижнего основания основания матрицы, а UGG(8)–Trp лежит в одной плоскости

$$\begin{array}{cccc}
 \text{UCC(10)–Ser} & \text{UCG(9)–Ser} & \text{UCU(8)–Ser} & \text{UCA(7)–Ser} \\
 \text{UGC(9)–Cys} & \text{UGG(8)–Trp} & \text{UGU(7)–Cys} & \text{UGA(6)–TERM} \\
 \text{UUC(8)–Phe} & \text{UUG(7)–Leu} & \text{UUU(6)–Phe} & \text{UUA(5)–Leu} \\
 \text{UAC(7)–Tyr} & \text{UAG(6)–TERM} & \text{UAU(5)–Tyr} & \text{UAA(4)–TERM}
 \end{array} \quad (18)$$

с терминальными кодонами UAA(4), UGA(6), UAG(6), которые имеют степени детерминации не больше 6 и находятся на равносильных боковых гранях с $d = 96$. В общем случае можно заметить, что, чем больше кодонов кодирует одну аминокислоту, тем больше сила каждого из них (8-10), уникальные кодоны, напротив, имеют невысокие степени детерминации (4-8).

Определим силу аминокислоты d_{AMK} как среднее арифметическое сил кодонов d_{codon} , детерминирующих ее

$$d_{\text{AMK}} = \frac{\sum d_{\text{codon}}}{n_{\text{deg}}}, \quad (19)$$

где n_{deg} — это ее степень вырожденности. То есть, для каждой из 20 аминокислот мы получили числовую характеристику d_{AMK} , которая показывает с какой силой детерминируется данная аминокислота. Эта зависимость и зависимость средней силы аминокислоты d_{AMK} от числа кодонов n_{deg} представлены в Таблице 1.

AMK	d_{AMK}	n_{deg}
Lys	4	2
Asn	5	2
Ile	$5\frac{1}{3}$	3
Glu/Met/Tyr	6	2/1/2
Phe/Asp/Gln	7	2/2/2
Val/Thr	$7\frac{1}{2}$	4/4
Leu	$7\frac{2}{3}$	6
Cys/Trp/Ser/His	8	2/1/6/2
Arg	$8\frac{1}{3}$	6
Gly	$8\frac{1}{2}$	4
Ala	$9\frac{1}{2}$	4
Pro	11	4

Это позволяет анализировать различные свойства аминокислот в зависимости от введенной силы (степени детерминированности d_{AMK}).

СВОЙСТВА РАВНОСИЛЬНЫХ СЕЧЕНИЙ

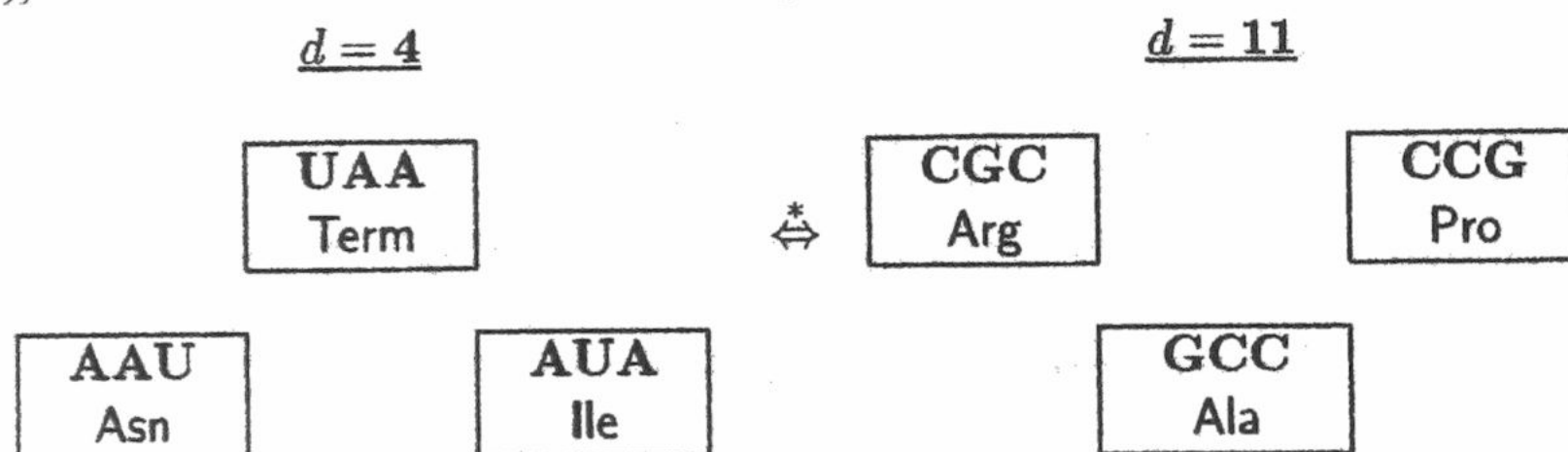
Рассмотрим геометрическое расположение в кубической матрице $\mathbb{K}$ кодонов, имеющих равную силу. Кодоны с одинаковой силой $d_{codon} = const$ лежат в плоскостях, перпендикулярных главной диагонали куба $AAA(3) - CCC(12)$. Можно показать, что таких плоскостей (или сечений) десять (с учетом двух угловых одноэлементных), которые представляются в виде различных геометрических фигур. Сила сечения $d_{section}$ определяется как сила каждого из входящих в него кодонов $d_{section} = d_{codon} = const$, а количество элементов в сечении находится в следующей зависимости от $d_{section}$

Сила сечения $d_{section}$	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число элементов в сечении	1	3	6	10	12	12	10	6	3	1

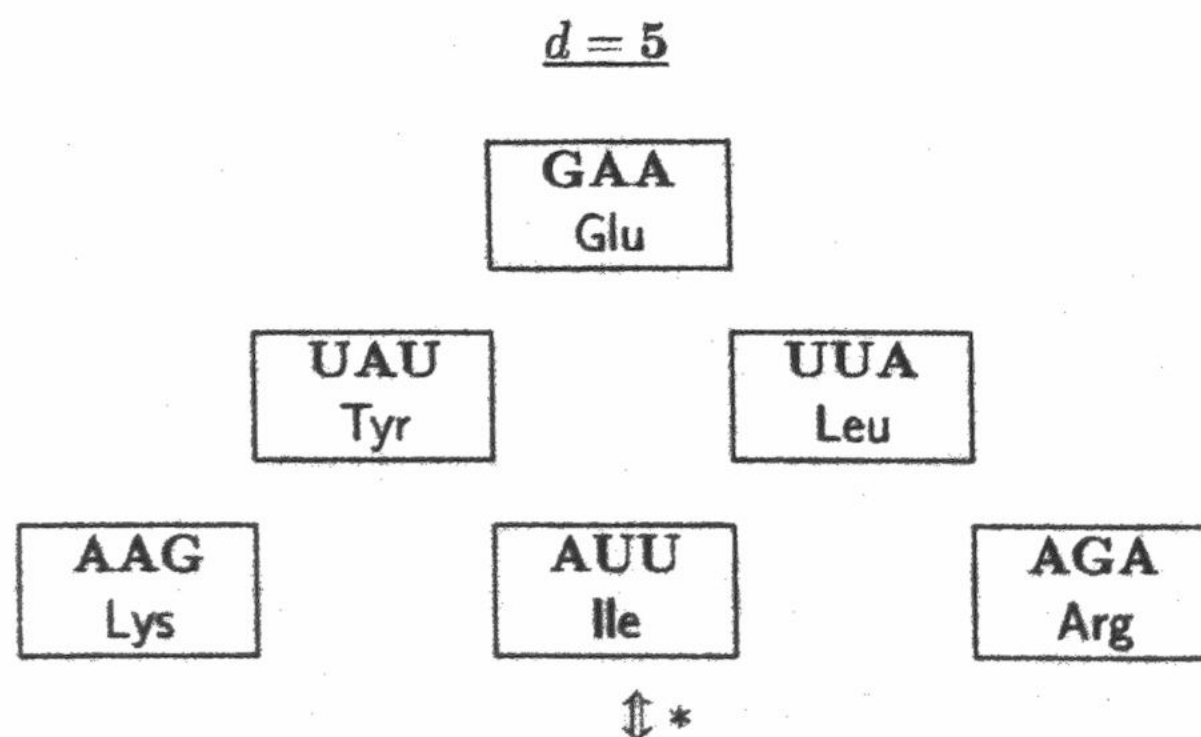
Отсюда видно, что десять сечений распадаются на пять взаимодополнительных пар, имеющих одинаковую форму и количество триплетов и связанных между собой пурин-пиримидиновой инверсией и отражением. Если силу сечения дополнительной пары обозначить $d_{section}^*$, то из Таблицы 2 следует формула

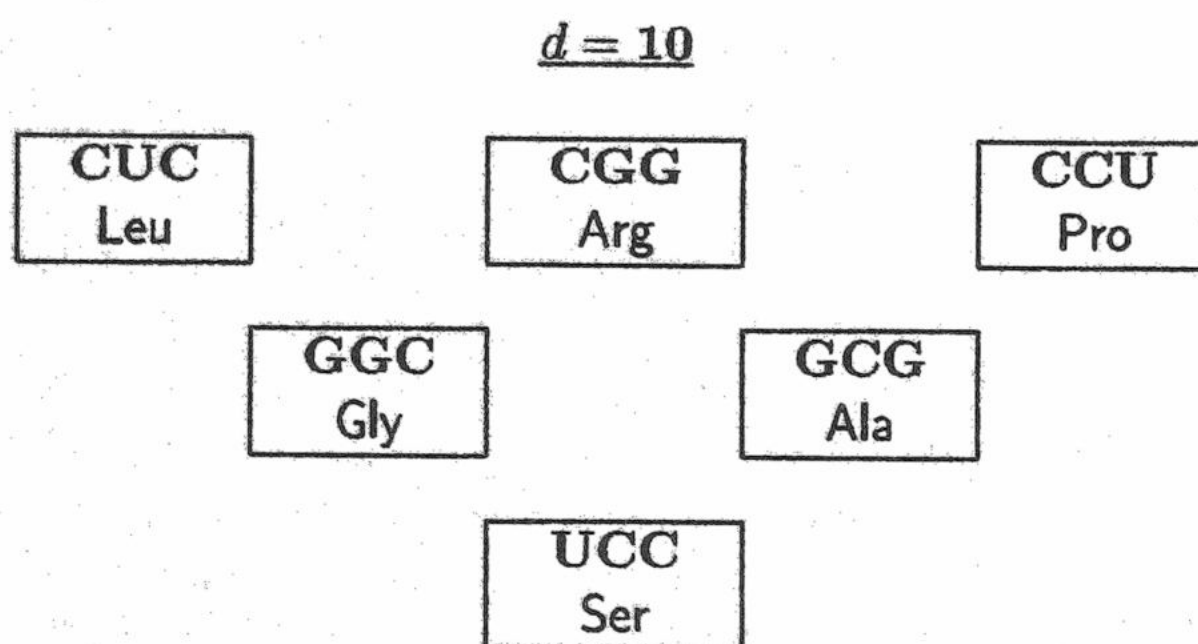
$$d_{section} + d_{section}^* = 15. \quad (20)$$

В простейшем случае одноэлементной пары наблюдается монотонная пурин-пиримидиновая инверсия $AAA(3) \xleftrightarrow{*} CCC(12)$. Следующая пара взаимодополнительных (в смысле формулы (20)) сечений состоит из плоскостей с тремя кодонами



Отметим, что сечение $d = 4$ не содержит “сильных” дуплетов, а сечение $d = 11$ не содержит “слабых” дуплетов. В остальных парах происходит смешение “слабых” и “сильных” дуплетов. Например, пара сечений с 6 элементами имеет вид





Видно, что сечение $d = 4$ ($d = 5$) является отображением в сечение $d = 11$ ($d = 10$) при действии пурин-пиримидиновой инверсии $G \xleftrightarrow{*} U, C \xleftrightarrow{*} A$ (1).

Примечательно, что подобные отображения и зеркальная симметрия с поворотом на угол π относительно оси y наблюдаются во всех парах геометрически подобных сечений с одинаковым числом элементов, что наглядно прослеживается из

$$\begin{aligned}
 d = 5 : & \text{AAG} \rightarrow \text{UAU} \rightarrow \text{GAA} \rightarrow \text{UUA} \rightarrow \text{AGA} \rightarrow \text{AUU} \\
 & \quad \quad \quad \updownarrow * \\
 d = 10 : & \text{CCU} \rightarrow \text{GCG} \rightarrow \text{UCC} \rightarrow \text{GGC} \rightarrow \text{CUC} \rightarrow \text{CGG}
 \end{aligned} \tag{21}$$

Пара сечений с силами 6 и 9 содержит в том числе и монотонные кодоны UUU и GGG, находящиеся на диагонали куба и внутри сечения

$$\begin{aligned}
 d = 6 : & \text{UUU} \rightarrow \text{AAC} \rightarrow \text{UAG} \rightarrow \text{GAU} \rightarrow \text{CAA} \rightarrow \text{GUA} \\
 & \quad \quad \quad \rightarrow \text{UGA} \rightarrow \text{ACA} \rightarrow \text{AGU} \rightarrow \text{AUG} \\
 & \quad \quad \quad \updownarrow * \\
 d = 9 : & \text{GGG} \rightarrow \text{CCA} \rightarrow \text{GCU} \rightarrow \text{UCG} \rightarrow \text{ACC} \rightarrow \text{UGC} \\
 & \quad \quad \quad \rightarrow \text{GUC} \rightarrow \text{CAC} \rightarrow \text{CUG} \rightarrow \text{CGU}
 \end{aligned}$$

Сечения с $d = 7$ и $d = 8$ содержат по три элемента, лежащих внутри периметра сечения

$$\begin{aligned}
 d = 7 : & \text{AUC} \rightarrow \text{UAC} \rightarrow \text{GAG} \rightarrow \text{CAU} \rightarrow \text{CUA} \rightarrow \text{GGA} \\
 & \quad \quad \quad \rightarrow \text{UCA} \rightarrow \text{ACU} \rightarrow \text{AGG} \rightarrow \text{UUG} \rightarrow \text{GUU} \rightarrow \text{UGU} \\
 & \quad \quad \quad \updownarrow * \\
 d = 8 : & \text{CGA} \rightarrow \text{GCA} \rightarrow \text{UCU} \rightarrow \text{ACG} \rightarrow \text{AGC} \rightarrow \text{UUC} \\
 & \quad \quad \quad \rightarrow \text{GAC} \rightarrow \text{CAG} \rightarrow \text{CUU} \rightarrow \text{GGU} \rightarrow \text{UGG} \rightarrow \text{GUG}
 \end{aligned}$$

ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ СИММЕТРИИ КУБИЧЕСКОЙ МАТРИЦЫ КОДОНОВ

Рассмотрим сечение с силой $d = 4$, включающее три элемента. Представим его в виде равностороннего треугольника в вершинах которого расположены кодоны (перечислены по часовой стрелке, начиная с нижней левой вершины):

$$\text{AAU} \rightarrow \text{UAA} \rightarrow \text{AUA}. \tag{22}$$

Элементы сечения имеют связность, так как кодоны отличаются друг от друга одним основанием.

Далее, каждый кодон можно в свою очередь представить как равносторонний треугольник, в вершинах которого лежат единичные нуклеотиды. Вращением, например, треугольника AAU вокруг оси z , перпендикулярной его плоскости на углы $\frac{2}{3}\pi$ и $\frac{4}{3}\pi$ можно получить последовательные превращения (переходы) элементов сечения (22).

Поворотом на положительный угол, относительно направленной оси, мы, как это общепринято [22], будем считать поворот, соответствующий вращению правого винта, то есть по часовой

стрелке, если смотреть вдоль оси в положительном направлении. Обозначим операцию вращения треугольника AAU на угол $\frac{2}{3}\pi$ как R_1 , а R_2 — поворот на $\frac{4}{3}\pi$, поворот AAU на нулевой угол обозначим E . Можно показать, что совокупность операций вращения E, R_1, R_2 вокруг оси z образует группу. Для доказательства этого утверждения составим таблицу умножения (таблицу Кэли). Согласно определению [22] совокупность Γ элементов $G_1, G_2, G_3 \dots$ называется группой, если задан закон “умножения” или операция, удовлетворяющая следующим требованиям. Результат умножения двух элементов G_a и G_b называется произведением и должен принадлежать группе. В нашем случае элементами группы являются повороты E, R_1, R_2 , а произведением — последовательное выполнение поворотов. Если поворот R_1 переводит систему из положения A в положение B, а поворот R_2 из положения B в положение C, то произведение $R_1 R_2$ переводит систему из A в C (закон умножения операций вращения). При повороте на нулевой угол треугольник переходит сам в себя, то есть E — операция тождественная, полностью соответствующая требованиям единичного элемента

$$R_1 \times E = R_1 ; R_2 \times E = R_2.$$

Двойное выполнение поворота на $\frac{2}{3}\pi$ идентично повороту на $\frac{4}{3}\pi$, поэтому $R_1 \times R_1 = R_2$. Аналогично находим произведения остальных элементов.

$G_a \setminus G_b$	E	R_1	R_2
E	E	R_1	R_2
R_1	R_1	R_2	R_1
R_2	R_2	E	R_1

Видно, что совокупность элементов Γ является группой, поскольку выполняются условия:

1. Произведение любых двух элементов принадлежит совокупности.
2. Условие ассоциативности, то есть при перемножении трех элементов не должно иметь значения в какой последовательности выполняется это умножение. Поскольку элемент группы — поворот, то это условие выполняется.
3. Единичный элемент оговорен выше, а существование обратного вытекает из таблицы умножения. Как произведение двух операций совмещения, так и действие обратное любой из них, естественно, являются операциями совмещения.

Таким образом мы доказали, что сечение со степенью детерминации $d = 4$ обладает свойствами группы. Аналогично можно доказать групповые свойства сечения $d = 11$, также содержащее три кодона

$$CCG \rightarrow CGC \rightarrow GCC \quad (23)$$

В каждом из сечений можно найти общее число пуриновых и пиримидиновых оснований.

$d_{section}$	n_C	n_G	n_U	n_A	$n_C + n_U$	$n_G + n_A$	Δn
3	0	0	0	3	0	3	-3
4	0	0	3	6	3	6	-3
5	0	3	6	9	6	12	-6
6	3	6	9	12	12	18	-6
7	6	9	12	9	18	18	0
8	9	12	9	6	18	18	0
9	12	9	6	3	18	12	6
10	9	6	3	0	12	6	6
11	6	3	0	0	6	3	3
12	3	0	0	0	3	0	3

График зависимости Δn от d представляет собой периодическую функцию с областью определения $\{3;12\}$ и областью значений на отрезке $\{-6;6\}$. Эта функция описывает колебания разности количества пиримидинов и пуринов в кодонах с одинаковыми степенями детерминации, что позволяет говорить об определенном биологическом смысле введенной нами степени детерминации нуклеотида d .

Отметим, что речь идет о зависимостях внутри генетического словаря, применимых и к одноцепочечным нуклеотидным последовательностям в отличие от Чаргаффа[23], описавшего пурин-пиримидиновые соотношения в молекуле ДНК. Таким образом, благодаря введенной степени детерминации нуклеотида возможно анализировать не только относительное и качественное, но и абсолютное содержание определенных нуклеотидов в любом генетическом тексте.

ВЫВОДЫ

Таким образом, алгебраический подход дает возможность по новому взглянуть на проблему генетического кода. Симметрии, наблюдаемые в коде проявляют себя в процессах выбора кодонов для определения различных аминокислот. Предложенная модель построена на основе различной способности нуклеотидов С, G, U, A однозначно детерминировать аминокислоту. Введенное понятие степени детерминации нуклеотида позволяет представлять генетические тексты как последовательность чисел от 1 до 4 (фактически в четверичной системе счисления). Анализ таких последовательностей может привести к более глубокому пониманию процессов транскрипции и, возможно, к формулировке новых принципов конструирования рекомбинантных ДНК, что в настоящее время является неотъемлемым компонентом развития методов клонирования и генной инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сингер М., Берг П. *Гены и геномы*. - М.: Мир, 1998. - 391 с.
2. Стент Г., Кэлиндар Р. *Молекулярная генетика*. - М.: Мир, 1981. - 646 с.
3. Hornos J. E. M., Hornos Y. M. M. *Model for the evolution of the genetic code* // *Phys. Rev. Lett.* - 1993. - V. 71. - P. 4401–4404.
4. Jarvis P. D., Bashford J. D. *Systematics of the genetic code and anticodon: history, supersymmetry, degeneracy and periodicity*. - Hobart: 1998. - 3 p. (Preprint / Univ. of Tasmania, physics/9809030).
5. Frappat L., Sorba P., Sciarrino A. *A crystal base for the genetic code*. - Lyon: 1997. - 12 p. (Preprint / Lab. de Phys. Theor. ENS; ENSLAPP-AL-671/97, physics/9801027).
6. Суходолец В. В. *Смысл генетического кода: реконструкция этапа предбиологической эволюции* // *Генетика*. - 1985. - Т. 21. - № 10. - С. 1589–1599.
7. Findley G. L., Findley A. M., McGlynn S. P. *Symmetry characteristics of the genetic code* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1982. - V. 79. - № 22. - P. 7061–7065.
8. Bashford J. D., Tsohantjis I., Jarvis P. D. *A supersymmetric model for the evolution of the genetic code* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1998. - V. 95. - P. 987–992.
9. Bashford J. D., Tsohantjis I., Jarvis P. D. *Codon and nucleotide assignments in a supersymmetric model of the genetic code* // *Phys. Lett.* - 1997. - V. A233. - P. 481–488.
10. Bashford J. D., Jarvis P. D., Tsohantjis I. *Supersymmetry and the genetic code* // *Physical Applications and Mathematical Aspects of Geometry, Groups, and Algebras*. - Singapore: World Sci., 1997. - P. 826–831.

11. Bhry T., Cziryk A., Vicsek T., Major B. *Application of vector space techniques to DNA // Fractals.* - 1998. - V. 6. - № 3. - P. 205–210.
12. Ичас М. *Биологический код.* - М.: Мир, 1971. - 351 с.
13. Ратнер В. А. *Структура и эволюция генетического кода // Итоги науки и техники. Сер. Мол. Биол. Т. 21.* - М.: ВИНТИ, 1985. - С. 158–197.
14. Maddox J. *The genetic code by numbers // Nature.* - 1994. - V. 367. - P. 111.
15. Льюин Б. *Гены.* - М.: Мир, 1987. - 544 с.
16. Сингер М., Берг П. *Гены и геномы.* - М.: Мир, 1998. - 373 с.
17. Румер Ю. Б. *О систематизации кодонов в генетическом коде // ДАН СССР.* - 1969. - Т. 187. - № 187. - С. 937–938.
18. Румер Ю. Б. *Систематизация кодонов в генетическом коде // ДАН СССР.* - 1968. - Т. 183. - № 1. - С. 225–226.
19. Румер Ю. Б. *О систематизации кодонов в генетическом коде // ДАН СССР.* - 1966. - Т. 167. - № 6. - С. 1393–1394.
20. Гантмахер Ф. Р. *Теория матриц.* - М.: Наука, 1988. - 548 с.
21. Карасев В. А. *Ромбический вариант генетического словаря на основе комплементарности кодирующих нуклеотидов // Вестн. Ленингр. ун-та.* - 1976. - Т. 1. - № 3. - С. 93–97.
22. Эллиот Д., Добер П. *Симметрия в физике.* - М.: Мир, 1983. - 364 с.
23. Бреслер С. Е. *Введение в молекулярную биологию.* - Л.: Наука, 1966. - 296 с.