

УДК 577.3

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОФЕИНА С РАЗЛИЧНЫМИ СТРУКТУРНЫМИ ФОРМАМИ ПОЛИРИБОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ: ЭКСПЕРИМЕНТ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

**А.В.Шестопалова, Т.В.Большух, М.А.Семенов**

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАНУ, ул.Акад.Проскуры, 12, Харьков, 61085*

*e-mail: shestop@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 8 сентября 2006 г.

Методами ИК-спектроскопии, пьезограмметрии и компьютерного моделирования (метод Монте Карло) выполнено исследование взаимодействия нейтральной односпиральной (polyrA) и протонированной двухспиральной (polyr(AH-AH)) форм полирибоадениловой кислоты с кофеином (Cf). Получены изотермы гидратации и ИК-спектры комплексов. Показано, что Cf не влияет на формирование упорядоченных форм polyrA и polyr(AH-AH). При образовании комплексов с Cf гидратация односпиральной polyrA уменьшается, а гидратация двухспиральной polyr(AH-AH) увеличивается по сравнению с гидратацией полинуклеотидов в свободном состоянии. Полученные при компьютерном моделировании энергетические и структурные характеристики и мгновенные конфигурации исследованных комплексов polyrA и polyr(AH-AH) с Cf позволили предложить их молекулярные модели. Для комплекса односпиральной polyrA с Cf возможны два типа связывания – частичная интеркаляция молекулы Cf между плоскостями соседних аденинов и внешнее связывание Cf. При образовании комплекса двухспиральной polyr(AH-AH) с Cf возможно только внешнее связывание молекул Cf вблизи сахарофосфатного остова полинуклеотидной матрицы. Для всех исследованных систем результаты моделирования методом Монте Карло качественно согласуются с экспериментальными результатами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ИК-спектроскопия, пьезограмметрия, метод Монте Карло, полирибоадениловая кислота, протонирование, кофеин, гидратация

Кофеин (Cf, 1,3,7-триметил, 2,6-диоксипурин, Рис.1) – один из наиболее распространенных биологически активных соединений. Он известен как стимулятор центральной нервной и сердечно-сосудистой систем [1,2]. В 80-е годы прошлого столетия активно исследовалась возможность проявления мутагенных свойств Cf. Анализ результатов этих исследований показал, что введение Cf в питательную среду вызывает изменение генетического материала на уровне клеточных культур [3,4]. Высказывались предположения о прямом взаимодействии Cf с биополимерами – белками и нуклеиновыми кислотами, чем можно было объяснить его влияние на репарационные процессы в клетке [5,6]. Несколькими методами были проведены исследования взаимодействия Cf и ДНК [7,8], результаты которых позволили предложить возможный механизм их взаимодействия. Так, было высказано предположение о нарушении гидратной оболочки ДНК в присутствии Cf как основе его биологической активности [9]. ИК-спектроскопические и пьезограмметрические исследования комплексов ДНК - Cf во влажных пленках подтвердили предположение об изменении гидратных свойств ДНК в присутствии кофеина, но не дали дополнительной информации о возможных местах связывания Cf на ДНК [10]. На примере исследования системы Cf – односпиральная полирибоадениловая кислота (polyrA) было сделано предположение о возможном встраивании молекул Cf между соседними нуклеотидами однонитевой спирали или связывание его на поверхности спирали с образованием водородных связей между карбонильными группами Cf и аминогруппами аденина [11].

В последние годы возобновились исследования влияние Cf на различные внутриклеточные процессы. Было показано, что молекулярная основа регуляторной функции Cf определяется его взаимодействием с ферментами, субстратами которых являются аденозин-содержащие соединения, например, циклический аденозин монофосфат (цАМФ) [12]. Поэтому Cf оказывает влияние на многие процессы, проходящие в клетке с участием цАМФ: скорость проведения нервного импульса [13]; фосфорилирование и дефосфорилирование рецепторов [6]; прохождение клетками полного клеточного цикла и процессы репарации ДНК [5,14,15]; апоптоз [16]. Такой широкий спектр влияния Cf на важнейшие биологические процессы стимулирует изучение молекулярных механизмов его действия. Кроме того, интерес к проблеме взаимодействия нуклеиновых кислот с Cf вызван обнаруженным в ряде исследований влиянием Cf на эффективность действия противоопухолевых антибиотиков, которые непосредственно взаимодействуют с ДНК: актиномицин, дауномицин, нагаломидин и др. [16,17].

В экспериментальных исследованиях систем, содержащих нуклеиновые кислоты и Cf [18], были получены данные, которые позволили авторам предположить возможность образования стабильных комплексов Cf с ДНК и односпиральной РНК. При этом интеркаляция является вероятным, но не преобладающим типом комплекса. Основной способ связывания Cf с нуклеиновыми кислотами – это внешнее расположение молекул Cf вблизи сахарофосфатного остова. В связи с этим фактом сделанное ранее предположение о влиянии Cf на гидратное окружение нуклеиновых кислот кажется достаточно обоснованным, поскольку гидратация фосфатных групп играет существенную роль в формировании гидратной оболочки нуклеиновых кислот и стабилизации их спиральной структуры.

Поэтому представляет интерес исследование комплексообразования Cf с модельным соединением – полирибоадениловой кислотой (polyrA), имеющей различные структурные формы (одно- и двуспиральную), формирование которых в пленках можно изучать в процессе их увлажнения. В настоящем исследовании нами предпринята попытка на молекулярном уровне изучить комплексы Cf с односпиральной нейтральной polyrA и двуспиральной, протонированной по положению N1 аденина polyr(АН-АН), методами пьезограмметрии, ИК-спектроскопии и компьютерного моделирования (метод Монте Карло). Сочетание этих методов позволяет определить изменение гидратного окружения полинуклеотидов в присутствии Cf; установить вероятные места связывания Cf на матрицах полинуклеотидов; предложить возможные механизмы образования комплексов с учетом гидратации polyrA и Cf. С помощью такого подхода ранее в нашей лаборатории были исследованы пленки свободных polyrA, polyr(АН-АН) [19, 20]. Результаты этих исследований использованы в данной работе для сравнения.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались кофеин и калиевая соль polyrA (фирма “Serva Feinbiochemica”), которая содержит один ион калия на фосфатную группу. Дополнительный контроль за содержанием ионов натрия и калия проводился с помощью пламенного фотометра. Чистота кофеина контролировалась спектрофотометрически в области поглощения кофеина – 260-290 нм. Растворы для получения пленок односпиральной polyrA-Cf готовили при соотношении P/D = 2 (где P, D - молярные концентрации полинуклеотида по фосфату и Cf, соответственно) в бидистиллированной воде при pH = 6,7. Комплекс двуспиральной polyrA с Cf получали в подкисленном водном растворе (значение pH = 4,5). Пленки комплексов готовили и дейтерировали так, как описано в работах [19,20]. ИК-спектры пленок комплексов получали на двухлучевом спектрофотометре UR-20, призмы NaCl и LiF, спектральная ширина щели составляла соответственно  $6\text{см}^{-1}$  и  $2\text{см}^{-1}$  на  $1800\text{см}^{-1}$ . Оптическую плотность определяли методом базовой линии, за которую принимали при построении спектра поглощения значение D на  $1800\text{см}^{-1}$ . ИК-спектры получали с помощью термостатированной кюветы, описанной в [21]. Определенную относительную влажность образцов задавали набором насыщенных растворов солей при комнатной температуре. Изотермы гидратации, представляющие зависимость числа сорбированных молекул воды (n) на один нуклеотид от относительной влажности (ОВ), получали для пленок комплексов с помощью пьезограмметрической установки, описанной в работе [22].

Для построения молекулярных моделей комплексов Cf и polyrA нами использован компьютерный метод Монте Карло, который позволяет получить как энергетические и структурные характеристики систем, содержащих изучаемые соединения и молекулы растворителя, так и мгновенные конфигурации, необходимые при построении моделей гидратного окружения исследуемых молекул. Применение метода Монте Карло для изучения гидратации биомолекул с использованием алгоритма Метрополиса [23] подробно описано в работах [24-26].

Конформация односпиральной polyrA (Рис.2), полученная на основе данных рентгеноструктурного анализа, соответствует А-форме РНК со стандартной  $C_3'$ -эндо конформацией сахара, содержит 9 нуклеотидов на виток, высота которого равна  $25,4\text{Å}$ , расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет  $2,82\text{Å}$ , а наклон оснований к оси спирали  $\sim 24^\circ$  [27].

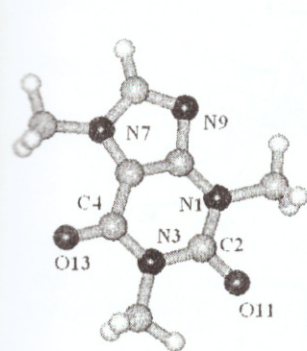


Рис.1. Молекула Cf



Рис.2. Односпиральная polyrA.

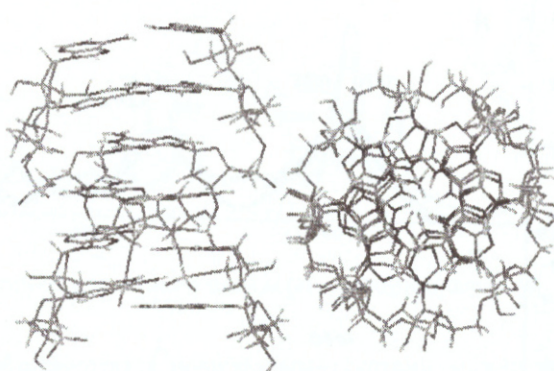


Рис.3. Две проекции двуспиральной протонированной polyr(АН-АН).

При pH  $\sim 4$  остатки аденина протонируются по положению N1 и происходит агрегация цепочек с образованием двойной спирали polyr(АН-АН), которая сохраняет такую структуру в водном растворе и при осаждении на холоде и вытягивании в волокна [28,29]. Rich и соавторы [30] по рентгеновской дифракции на волокнах polyrA предложили двуспиральную структуру polyr(АН-АН), у которой ось симметрии второго порядка совпадает с осью спирали и поэтому имеет место параллельная ориентация цепей. Шаг спирали составляет  $30,4\text{Å}$  с 8 парами оснований на виток и расстоянием между ними  $3,8\text{Å}$ , углом спирального вращения  $45^\circ$  и углом наклона пары  $10^\circ$ . Структуры фрагментов polyrA и polyr(АН-

АН) построены на основе приведенных выше данных рентгеноструктурного анализа и представлены на Рис.2,3. Выбор гексануклеотидов как фрагмента упорядоченных структур polyrA обусловлен тем, что формирование стабильной двуспиральной polyr (АН-АН), согласно данным исследования олигомеров полирибоадениловой кислоты с помощью кругового дихроизма, начинается с зародыша порядка 6 пар нуклеотидов [31].

Используя экспериментальные данные, полученные в нашем исследовании комплексов полирибоадениловая кислота – Cf, и литературные данные, нами были построены несколько возможных молекулярных моделей комплексов Cf – polyrA, polyr(АН-АН) и после выполнения процедуры минимизации в силовом поле AMBER 96 [32] отобраны структуры для комплексов Cf с одно- и двуспиральной формами polyrA, соответствующие минимумам энергии, для моделирования методом Монте Карло в кластере из 800 молекул воды.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Экспериментальные исследования комплексов полирибоадениловой кислоты и кофеина

Нами получены изотермы гидратации и ИК-спектры комплексов одно- и двуспиральной форм polyrA с Cf в широком диапазоне относительной влажности. В таблице 1 представлены основные полосы поглощения polyrA, Cf и их отнесения. Для понимания влияния Cf на спектральные и гидратационные параметры двух структурных форм polyrA необходимо сравнить наши результаты с полученными ранее в аналогичных условиях проведения эксперимента ИК-спектроскопическими и пьезограмметрическими данными для свободных одно- и двуспиральной форм polyrA и Cf [19,20,34]. ИК-спектры polyrA, polyr (АН-АН) и Cf при нескольких значениях ОВ представлены на Рис.4,5,6.

Таблица 1. Отнесения для полос поглощения polyrA и Cf (900-1710  $\text{см}^{-1}$ ) [19,20]

Частота, $\text{см}^{-1}$	Отнесение
969	колебания С-С групп атомов рибозы
1030	колебания внешней группы атомов С-С рибозного кольца
1052	валентные колебания С-О -групп сахарофосфатного остова
1088	симметричные колебания фосфатных групп $\text{PO}_2^-$
1225	антисимметричные колебания фосфатных групп $\text{PO}_2^-$
1480	валентные колебания С-N аденина
1625	валентные колебания С=N- аденина
1640	деформационные колебания $\text{N}_6\text{H}_2$ -группы аденина
1660	валентные колебания $\text{C}_2\text{O}_{11}$ -групп кофеина
1705	валентные колебания $\text{C}_4\text{O}_{13}$ -групп кофеина

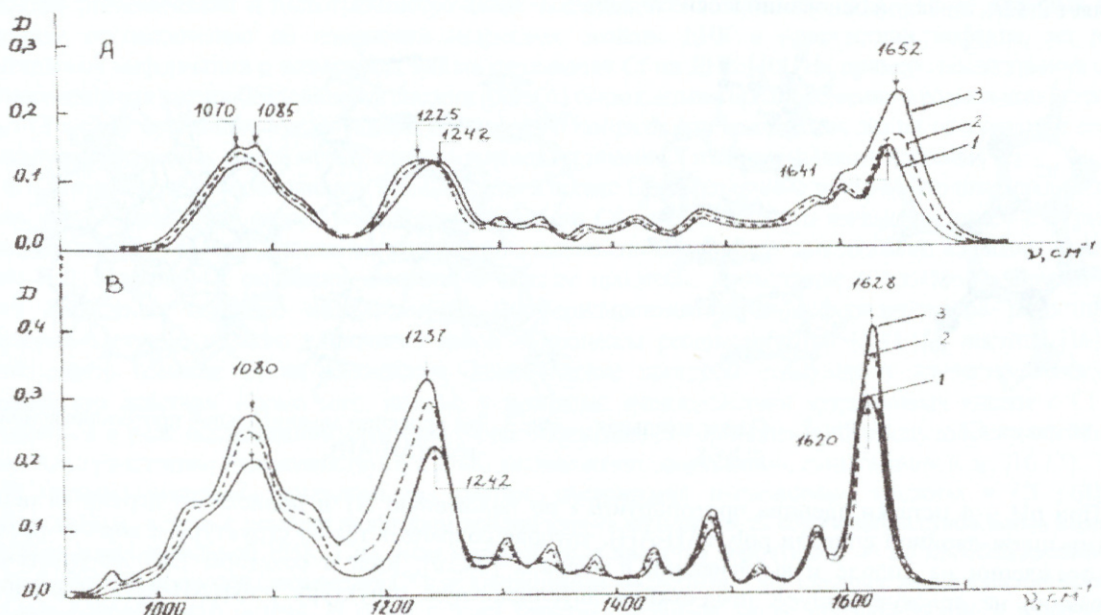


Рис.4. Спектры пленок односпиральной polyrA в недеутерированном (А) и дейтерированном (В) состояниях при ОВ: 1 – 0%, 2 – 65%, 3 – 92% [19].

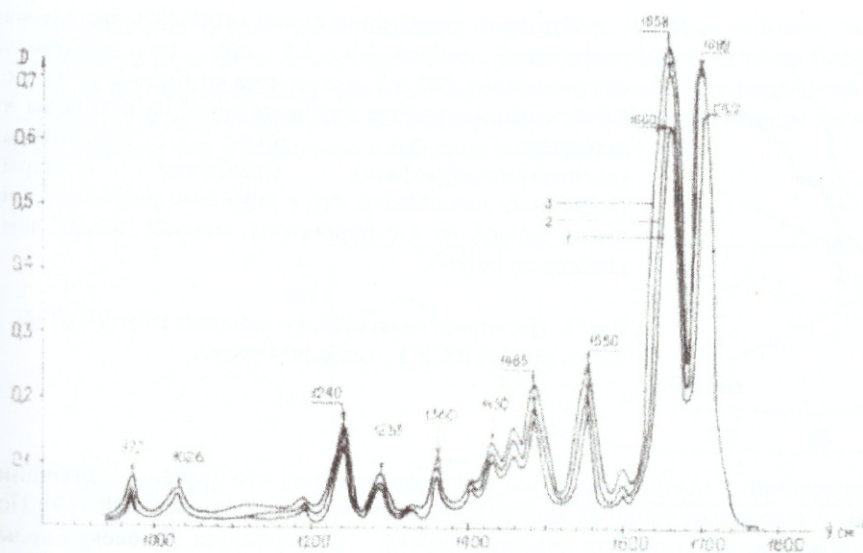


Рис.5. Спектры напыленных образцов кофеина в  $H_2O$  при ОВ: 1 – 0%, 2 – 86%, 3 – 94% [34].

В экспериментальных исследованиях ориентированных пленок polyrA было показано наличие стэкинга у нейтральной polyrA, который стабилизирует односпиральную структуру polyrA [31]. Методами пьезограмметрии, ИК-спектроскопии и КВЧ-диэлектротрии было показано, что при сорбции 10-12 ( $\pm 1$ ) молекулы воды на нуклеотид формируется устойчивая односпиральная форма polyrA [19].

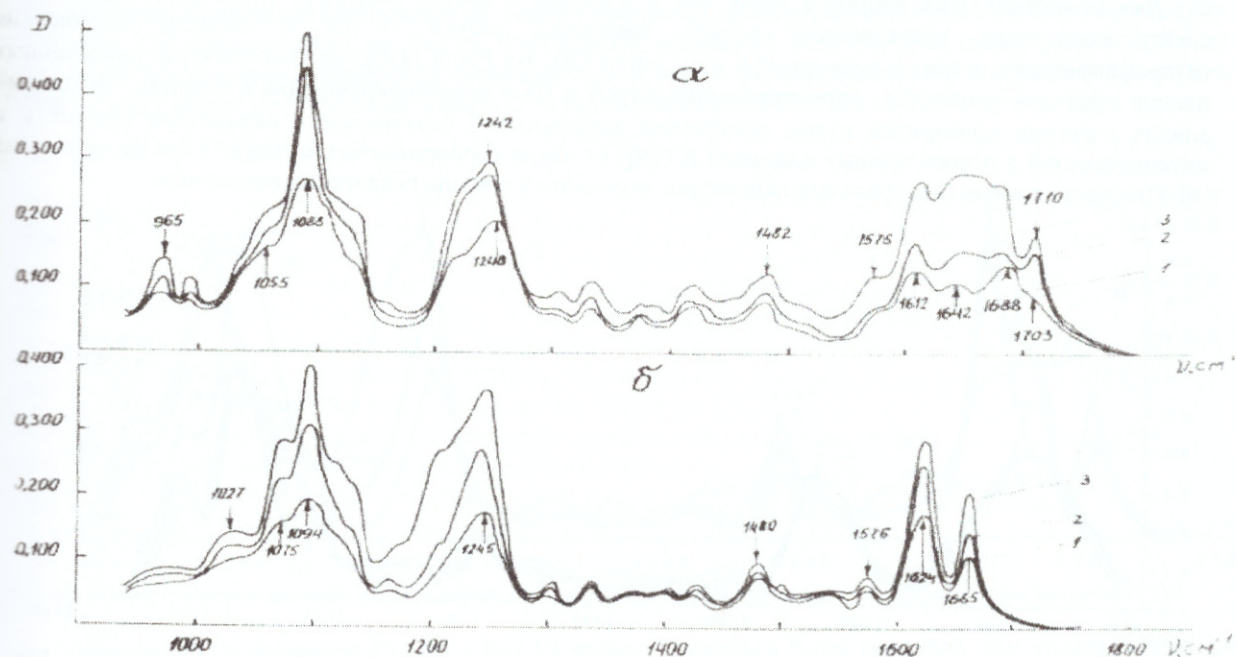


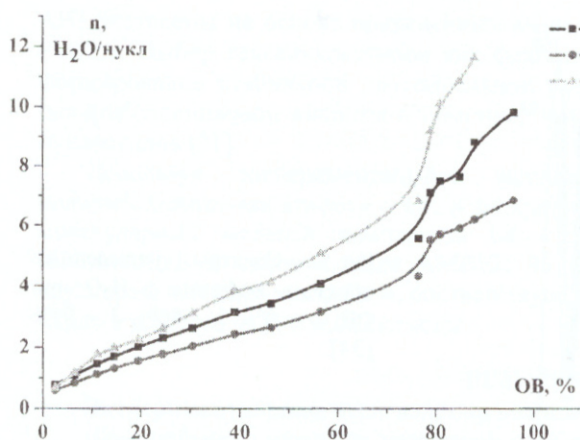
Рис.6. Спектры пленок двуспиральной протонированной polyrA в нейтрированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 – 0%, 2 – 56%, 3 – 90% [20].

Двуспиральная структура polyr(АН-АН) стабилизируется водородными связями между остатками протонированного по положению N1 аденина:  $N6H...N7$  и  $N6H...OP$ . Благодаря таким взаимодействиям двуспиральная polyr(АН-АН) сохраняет свою структуру даже при полной дегидратации [31]. У двуспиральной polyrA гидратно-активные центры аденинов (атомы N7 и аминогруппы  $NH_2$ ) участвуют в образовании межцепочечных водородных связей, поэтому связывание молекул воды при увлажнении будет определяться гидратацией сахарофосфатного остова. Полная гидратация протонированной двуспиральной polyr(АН-АН) соответствует 7-8 молекулам воды на нуклеотид [20].

*Комплекс односпиральной polyrA с кофеином.*

На Рис.7 приведены изотермы гидратации комплекса односпиральной polyrA - Cf (1), смеси односпиральной polyrA и Cf (2) и свободной односпиральной polyrA (3).

## Молекулярные механизмы взаимодействия кофеина...



Изотерма гидратации смеси строилась как сумма гидратаций *polyrA* и Cf при их молярных соотношениях  $P/D = 2$ , а изотерма комплекса *polyrA* с Cf строилась с учетом сорбированной на нем воды в пересчете на моль нуклеотида (аденозинмонофосфата). Сравнение изотерм гидратации показывает, что и комплекс *polyrA* с Cf, и смесь *polyrA* и Cf сорбируют меньше воды, чем свободная *polyrA*.

Рис. 7. Изотермы гидратации: 1 – комплекс *polyrA* с Cf; 2 – смесь *polyrA* и Cf; 3 – свободная *polyrA*.

Ранее по данным ИК-спектроскопии и пьезограмметрии было установлено, что степень гидратации свободной односпиральной *polyrA* составляет около 12 молекул воды на нуклеотид при 90% ОВ [19]. По изотермам гидратации (Рис.7) можно определить, что комплекс *polyrA* – Cf сорбирует 9 молекул воды при ОВ 90%, а смесь *polyrA* и Cf – только 6 – 7 молекул воды. Причиной изменения сорбционных свойств *polyrA* может быть: (1) образование водородных связей между донорно-акцепторными группами кофеина и *polyrA*, что вызывает дегидратацию таких групп атомов; (2) внешнее связывание молекул кофеина вблизи поверхности полинуклеотидной матрицы, в результате которого уменьшается гидратация сахарофосфатного остова *polyrA*.

Для выяснения этих вопросов нами, как и в случае с чистой *polyrA* [19], были проведены ИК-спектроскопические исследования пленок комплекса *polyrA* – Cf в области поглощения сахарофосфатного остова и аденина при изменении ОВ. На Рис.8 представлены спектры увлажненных пленок образцов комплекса односпиральной *polyrA* с Cf в нейдетерированном состоянии. Детальный анализ спектров проводился путем построения зависимостей спектральных параметров (частот  $\nu$  и интенсивностей в относительных единицах R [19]) от числа сорбированных молекул воды на нуклеотид ( $n$ ). По «насыщению» спектральных параметров определяли степень гидратации комплекса.

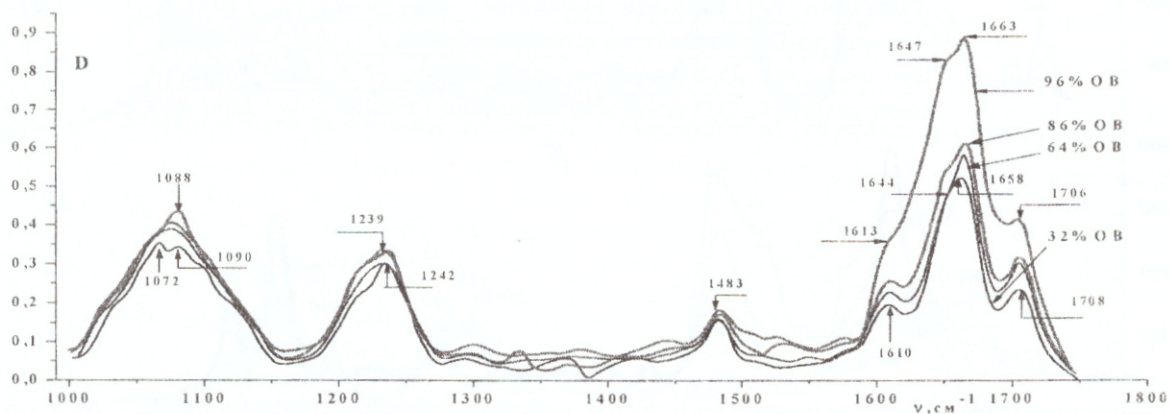


Рис.8. Спектры пленок комплекса односпиральной *polyrA* и Cf в нейдетерированном состоянии при различных ОВ.

При увлажнении пленок спектральная область поглощения симметричного колебания фосфатных и рибозных групп комплекса практически не отличается от этой области в спектрах поглощения свободной односпиральной *polyrA* (Рис.4). Наибольшие изменения спектральных параметров комплекса наблюдаются в области полосы поглощения антисимметричного колебания фосфатных групп  $\nu_{as} = 1242 \text{ см}^{-1}$  (Рис.8) по сравнению со свободной односпиральной *polyrA* (Рис.4А). Частотный сдвиг и рост интенсивности этой полосы и у комплекса, и у свободной односпиральной *polyrA* начинаются при 36% ОВ и заканчиваются при 76% - 90% ОВ. Но величина частотного сдвига в спектрах комплекса значительно меньше ( $\Delta\nu_{as} \approx 3-4 \text{ см}^{-1}$ ), чем у свободной односпиральной *polyrA*, для которой он составляет  $\Delta\nu_{as} \approx 17 \text{ см}^{-1}$  (Рис.4). Низкочастотный сдвиг и рост интенсивности этого валентного колебания в обоих случаях свидетельствует об образовании водородных связей между молекулами воды и фосфатными группами полинуклеотидной матрицы. Изменения спектральных параметров этой полосы поглощения для образцов комплекса *polyrA* с Cf могут быть результатом уменьшения числа молекул воды, образующих водородные связи с фосфатными группами

односпиральной polyrA из-за внешнего связывания молекул кофеина, которое привело к уменьшению доступности акцепторов водородной связи полинуклеотидной матрицы (атомов кислорода фосфатных групп polyrA) для молекул воды. Из зависимостей  $\nu$  и  $R$  от  $n$ , приведенных на Рис.9 видно, что степень гидратации комплекса polyrA с Cf соответствует 8-9 молекулам воды на нуклеотид, что на 3-4 молекулы воды меньше, чем у свободной односпиральной polyrA [19].

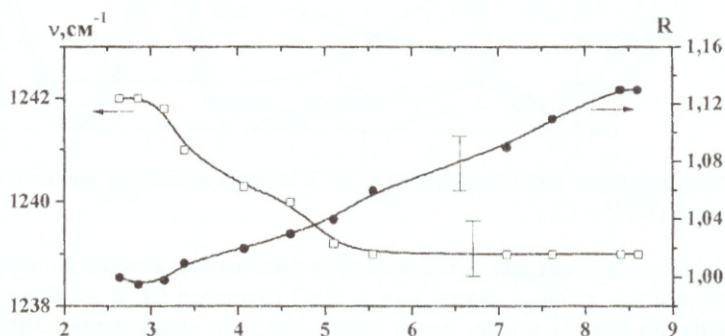


Рис. 9. Зависимости частоты ( $\nu$ ) и интенсивности ( $R$ ) от  $n$  полосы антисимметричного колебания фосфатных групп комплекса односпиральной polyrA с Cf.

Поскольку в области поглощения кратных связей аденина и карбонильных групп кофеина ( $1600-1720 \text{ cm}^{-1}$ ) существенный вклад вносят деформационные колебания легкой воды ( $\nu_{\text{max}} = 1640 \text{ cm}^{-1}$ ), то эту спектральную область мы анализировали при увлажнении дейтерированных пленок комплекса в парах тяжелой воды. Спектры дейтерированных пленок комплекса односпиральной polyrA с Cf при нескольких значениях ОВ представлены на Рис.10. Рассмотрим изменения спектров комплекса polyrA с Cf по сравнению со спектрами свободной односпиральной polyrA в дейтерированном состоянии (Рис. 5В) в области поглощения C=N-групп аденина и C=O групп кофеина ( $1600-1720 \text{ cm}^{-1}$ ).

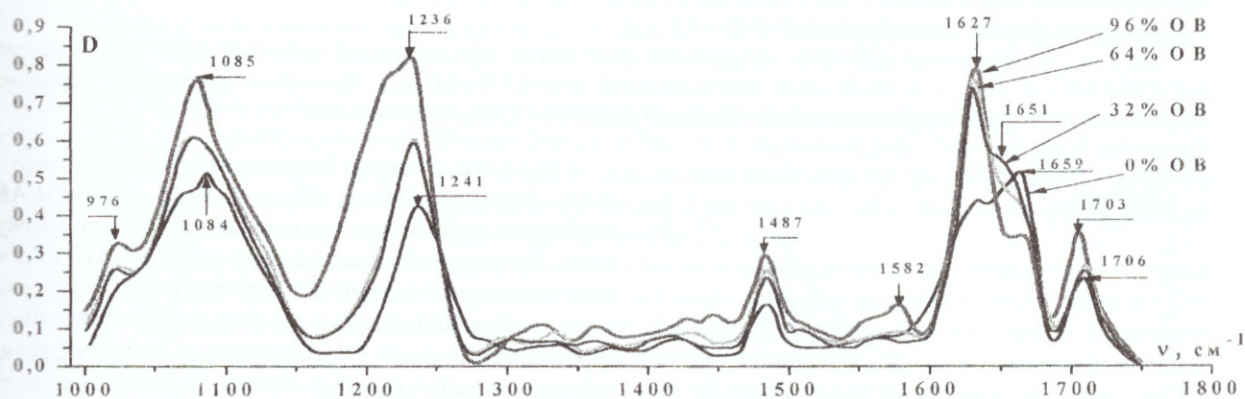


Рис.10. Спектры пленок комплекса односпиральной polyrA с Cf в дейтерированном состоянии при различных ОВ.

Как видно из сравнения Рис.5В и Рис.10, спектр комплекса более сложный, чем спектр свободной polyrA, и состоит из перекрывающихся полос поглощения аденина  $\nu_{\text{C=N}} = 1620 \text{ cm}^{-1}$  и полос поглощения карбонильных групп кофеина  $\nu_{\text{C=O11}} = 1658 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu_{\text{C=O13}} = 1698 \text{ cm}^{-1}$ . При увлажнении пленок комплекса односпиральной polyrA с Cf появляется смещенная в «голубую» область спектра полоса поглощения аденина при  $\nu_{\text{C=N}} = 1627 \text{ cm}^{-1}$  (Рис.10), что свидетельствует, как и в случае чистой односпиральной polyrA (Рис.5В, [19]), о переходе polyrA в процессе увлажнения из неупорядоченного состояния при 0% ОВ в односпиральную структуру при  $\sim 32\% - 56\%$  ОВ. Одновременно происходит смещение полосы поглощения карбонильных групп кофеина в «красную» область спектра (Рис.11, зависимость частоты и интенсивности одной из полос поглощения карбонильных групп кофеина).

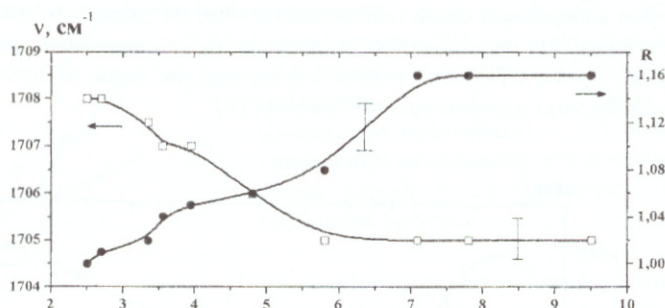


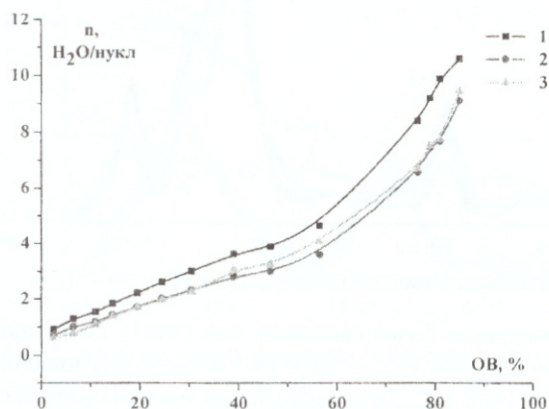
Рис. 11. Зависимости частоты ( $\nu$ ) и интенсивностей ( $R$ ) от  $n$  полосы колебания карбонильной C4=O13 группы Cf комплекса односпиральной polyrA с Cf.

Такой характер изменения спектральных параметров валентного колебания карбонильных групп может быть вызван образованием водородных связей между C=O группами Cf и молекулами воды и, возможно, с аминогруппами аденина. Из Рис. 11 можно также определить, что «насыщение»  $R(n)$  наступает при сорбции пленками комплекса порядка  $n = 8 (\pm 1)$  молекулы воды, поэтому степень гидратации комплекса соответствует 8–9 молекулам воды на нуклеотид. Это значение согласуется с результатом определения степени гидратации комплекса, полученным из анализа изменения спектральных параметров комплекса polyrA с Cf для полосы поглощения антисимметричного колебания фосфатных групп.

Поэтому на основе проведенного анализа изотерм гидратации и ИК-спектров пленок комплекса односпиральной polyrA с Cf в процессе увлажнения можно предположить, что кофеин и односпиральная polyrA могут образовать комплекс в результате внешнего связывания молекул Cf, что приводит к уменьшению гидратации фосфатных групп. Не исключена возможность образования водородных связей между карбонильными группами кофеина и амногруппами аденина. Молекулы воды в комплексе могут образовывать мостики и/или непосредственно связываться с гидратно-активными группами кофеина и полинуклеотидной матрицы. Более детальную информацию о структуре комплекса, основываясь на этих предположениях, можно получить с помощью компьютерного моделирования.

#### Комплекс двуспиральной polyr(АН-АН) с Cf

На Рис. 12 приведены изотермы гидратации комплексов двуспиральной polyr(АН-АН) с Cf (1), смеси polyr(АН-АН) и Cf (2) и свободной двуспиральной polyr(АН-АН) (3). Изотермы гидратации строились аналогично изотермам гидратации односпиральной polyrA и Cf, описанным выше.



Сравнение изотерм гидратации показывает, что и смесь polyr(АН-АН) и Cf, и чистая polyr(АН-АН) сорбируют практически одинаковое количество молекул воды. Но комплекс двуспиральной polyr(АН-АН) с Cf во всем интервале значений ОВ сорбирует больше молекул воды, чем свободная polyr(АН-АН), и при  $\sim 90\%$  ОВ его сорбция составляет  $\sim 11-12$  молекул воды на нуклеотид, что на  $\sim 2$  молекулы воды больше, чем сорбция смеси или свободной polyr(АН-АН).

Рис. 12. Изотермы гидратации: 1 – комплекс polyr(АН-АН) с Cf; 2 смеси polyr(АН-АН) и Cf; 3 – свободная polyr(АН-АН).

На Рис. 13 и Рис. 14. приведены ИК-спектры пленок комплексов двуспиральной polyr(АН-АН) с Cf при нескольких значениях ОВ в недеирированном и дейтерированном состояниях. Наличие полосы аденина  $\nu_{C-N} = 1626 (\pm 1 \text{ см}^{-1})$  в комплексе polyr(АН-АН) с Cf (Рис.14) и у свободной polyr(АН-АН) (Рис.6б) для дейтерированных пленок свидетельствует о том, что протонированный полинуклеотид polyr(АН-АН) находится в двуспиральном состоянии во всем интервале ОВ.

Сравнение спектров свободной двуспиральной polyr(АН-АН) и ее комплекса с Cf позволяет также определить, что сдвиг полосы антисимметричного колебания фосфатных групп ( $\nu_{as} = 1244 \text{ см}^{-1}$ ) в низкочастотную область для недеирированных пленок комплекса составляет  $\Delta\nu_{as} \sim 5 (\pm 2) \text{ см}^{-1}$  (Рис.13), а для свободной двуспиральной polyr(АН-АН) такой сдвиг несколько меньше (Рис.6а). Возможно, что в присутствии Cf фосфатные группы двуспиральной полинуклеотидной матрицы связывают больше молекул воды, чем свободная двуспиральная polyr(АН-АН).

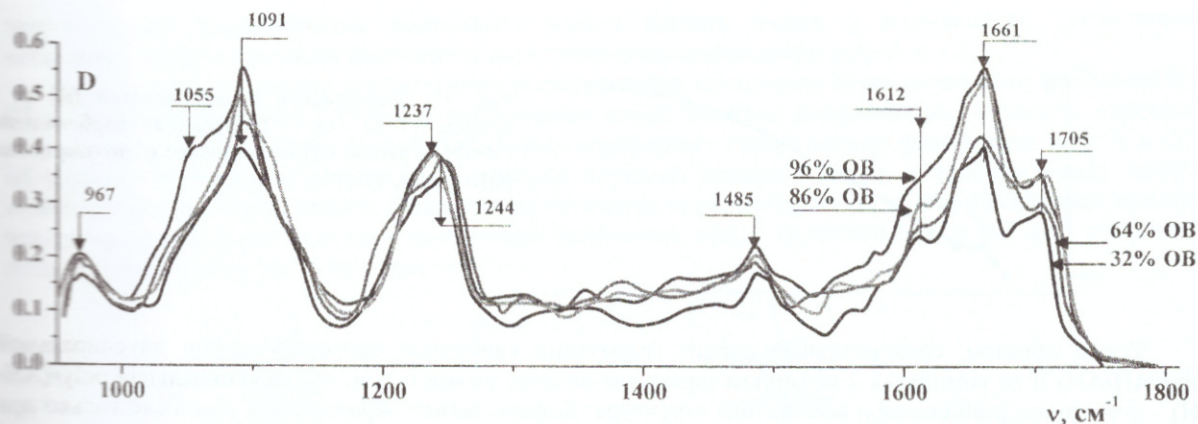


Рис. 13. Спектры пленок комплекса двуспиральной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  с Cf в недеирированном состоянии при различных ОВ.

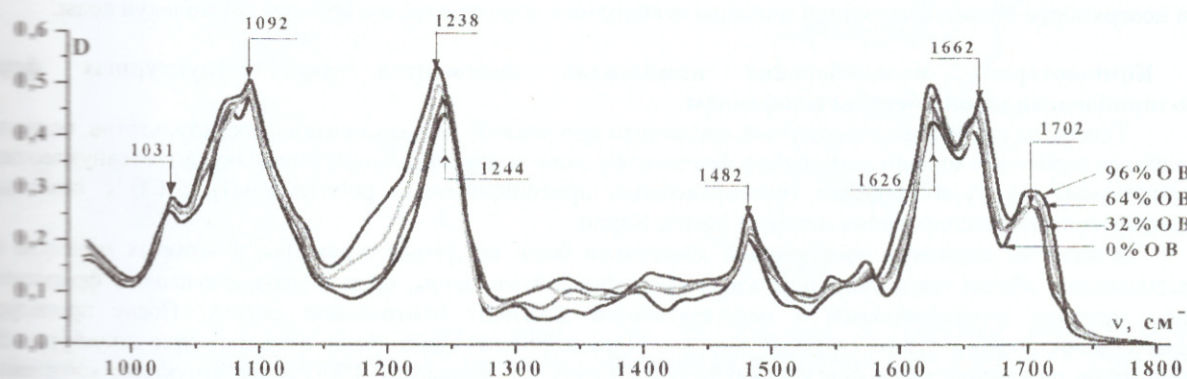


Рис. 14. Спектры пленок комплекса двуспиральной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  с Cf в дейтерированном состоянии при разных значениях ОВ.

Нами также зафиксирована задержка низкочастотного сдвига полосы антисимметричного колебания фосфатных групп у недеирированных образцов (Рис.6А и Рис.13). У свободной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  такой частотный сдвиг начинается при низких ОВ (2-4 молекулы воды на нуклеотид) и заканчивается при связывании 6-7 молекул воды на нуклеотид. В комплексе начало сдвига фиксируется при более высоких ОВ (~ при 4-5 молекулах воды на нуклеотид), а завершение сдвига – при 10-11 молекулах воды (Рис.15).

Что касается второго спектрального параметра – интенсивности полос поглощения, которая чувствительна к межмолекулярным взаимодействиям, то с ростом ОВ у всех полос спектров комплекса она растет до  $n = 10-11$  молекул воды на нуклеотид (Рис.15,16,17). Это на 2-3 молекулы воды больше, чем у свободной двуспиральной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  [20]. Такое изменение в степени гидратации комплекса, по-видимому, вызвано одновременным связыванием молекул воды как с фосфатными группами полинуклеотидной матрицы, так и с карбонильными группами кофеина при формировании внешней гидратной оболочки комплекса.

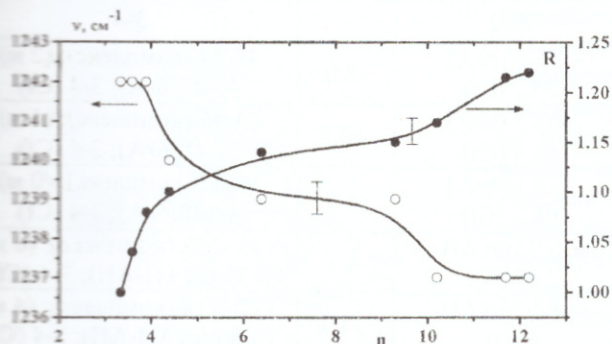


Рис. 15. Зависимости частоты ( $\nu$ ) и интенсивности ( $R$ ) от  $n$  полосы антисимметричного колебания фосфатных групп  $\nu_{\text{ас}}$  двуспиральной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  в комплексе с Cf.

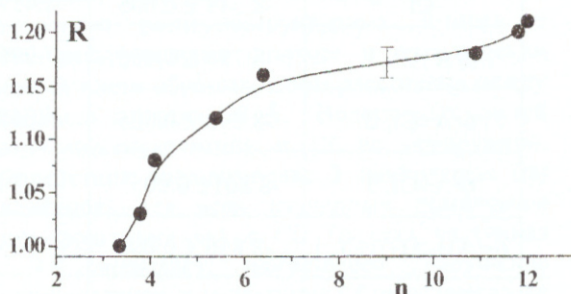


Рис. 16. Зависимости интенсивностей ( $R$ ) от  $n$  полосы  $1626 \text{ см}^{-1}$  двуспиральной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  в комплексе с Cf.



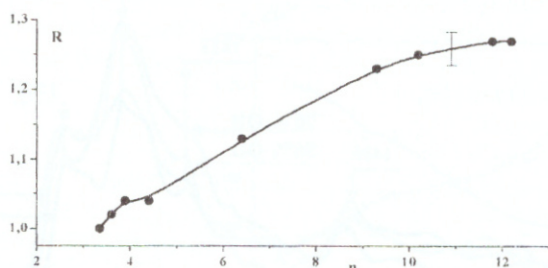


Рис. 17. Зависимости интенсивностей ( $R$ ) от  $n$  полосы  $1702 \text{ см}^{-1}$  (колебания карбонильной  $\text{C4=O13}$  группы  $\text{Cf}$ ) в комплексе с двуспиральной  $\text{polyr(АН-АН)}$ .

Таким образом, сравнительный анализ гидратации свободной протонированной двуспиральной  $\text{polyr(АН-АН)}$  и ее комплекса с кофеином позволяет сделать вывод о том, что двуспиральная  $\text{polyr(АН-АН)}$  - достаточно стабильная и компактная структура. Кофеин может образовывать комплекс только при внешнем связывании на поверхности спирали полинуклеотидной матрицы. Увеличение гидратной оболочки комплекса двуспиральной  $\text{polyr(АН-АН)}$  с  $\text{Cf}$  на 3-4 молекулы воды на нуклеотид по сравнению со свободной двуспиральной  $\text{polyr(АН-АН)}$  свидетельствует о том, что для связывания молекул кофеина на поверхности полинуклеотидной матрицы необходимо дополнительное количество молекул воды.

#### Компьютерное моделирование комплексов фрагментов двух структурных форм полирибоадениловой кислоты с кофеином

Теперь на основе предположений, сделанных при анализе экспериментальных результатов, получим наиболее вероятные модели комплексов фрагментов одно- и двуспиральной форм  $\text{polyrA}$  (гексануклеотида нейтральной  $\text{polyrA}$  и дуплекса гексануклеотида протонированной  $\text{polyr(АН-АН)}$  с  $\text{Cf}$ ) с помощью компьютерного моделирования методом Монте Карло.

В качестве стартовых конформаций комплексов были построены структуры, в которых молекула  $\text{Cf}$  располагалась вблизи гексануклеотида вдоль сахарофосфатного остова одно- и двухцепочечного фрагментов либо частично интеркалирована в одноцепочечный фрагмент нейтральной  $\text{polyrA}$ . После процедуры минимизации энергии таких структур (без учета растворителя) нами были отобраны три структуры для комплексов одноцепочечного фрагмента  $\text{polyrA}$  и  $\text{Cf}$  ( $6rA+\text{Cf}$ , комплексы 1,2,3) и две структуры комплексов двухцепочечных фрагментов  $\text{polyrA}$  и  $\text{Cf}$  ( $6r(\text{АН-АН})+\text{Cf}$ , комплексы 1,2), которые помещались в кластер из 800 молекул воды. Далее выполнялось моделирование методом Монте Карло и были получены равновесные конфигурации комплексов. Энергетические и структурные характеристики этих систем приведены в таблице 2. Здесь  $U_{\text{TOT}/1}$  - полные средние потенциальные энергии систем и  $U_{\text{WW}/1}$  - средние энергии взаимодействия вода-вода (в пересчете на одну молекулу воды);  $U_{\text{WS}}$  - средние энергии взаимодействия вода-растворенное вещество и  $U_{\text{SS}}$  - средние энергии взаимодействия растворенное вещество-растворенное вещество (в пересчете на всю систему);  $N_{\text{Нб}}$  - число молекул воды, образующих водородные связи с растворенным веществом, в скобках приведено число молекул воды, занимающих мостиковые положения между донорно-акцепторными группами олигонуклеотидов и  $\text{Cf}$ .

Таблица 2. Энергетические характеристики систем  $\text{Cf}$ ,  $6rA + \text{Cf}$  и  $6r(\text{АН-АН}) + \text{Cf}$  в кластере из 800 молекул воды и кластера «чистой» воды (данные приведены в ккал/моль: \* - на одну молекулу воды, \*\* - в целом на систему).

Система	* $U_{\text{TOT}/1}$	* $U_{\text{WW}/1}$	** $U_{\text{WS}}$	** $U_{\text{SS}}$	$N_{\text{Нб}}$
$\text{Cf}$	$-8.549 \pm 0.005$	-8.453	-75.2	-	3-4
$6rA+\text{Cf}$ , 1	$-8.784 \pm 0.005$	-7.996	-555.2 ( $6rA$ ) -70.1 ( $\text{Cf}$ )	-5.0	48-49 (комплекс): (2 м) 46-47( $6rA$ ); 3-4 ( $\text{Cf}$ )
$6rA+\text{Cf}$ , 2	$-8.798 \pm 0.005$	-8.068	-505.5 ( $6rA$ ) -66.4 ( $\text{Cf}$ )	-10.3	44-46 (комплекс): (4 м) 41-42( $6rA$ ); 3-4 ( $\text{Cf}$ )
$6rA+\text{Cf}$ , 3	$-8.801 \pm 0.005$	-7.980	-579.3 ( $6rA$ ) -68.3 ( $\text{Cf}$ )	-8.5	50-52 (комплекс): (0 м) 47-48( $6rA$ ); 3-4 ( $\text{Cf}$ )
$6r(\text{АН-АН})+\text{Cf}$ , 1	$-8.856 \pm 0.005$	-7.979	-635.2 ( $6r(\text{АН-АН})$ )	-4.1	130-133 (комплекс): (6 м) 76-78 $6r(\text{АН-АН})$ ; 3-4 ( $\text{Cf}$ )
$6r(\text{АН-АН})+\text{Cf}$ , 2	$-8.889 \pm 0.005$	-7.993	-638.6 ( $6r(\text{АН-АН})$ )	-11.1	112-114 (комплекс): (4 м) 79-80 $6r(\text{АН-АН})$ ; 3-4 ( $\text{Cf}$ )
$\text{H}_2\text{O}$ (800)	$-8.530 \pm 0.005$	-8.530	-	-	-

Как видно из приведенных в таблице 2 результатов моделирования, все системы энергетически стабильны. Значительных отличий в полных энергиях комплексов не зафиксировано. Поэтому из анализа

энергетических характеристик комплексов можно сделать вывод о возможности существования нескольких форм комплексов фрагментов двух типов спиральных форм polyrA и Cf.

Рассмотрим мгновенные конфигурации исследованных комплексов односпирального фрагмента brA с Cf. Структура комплекса 1 (Рис.18) представляет собой внешнее расположение молекулы кофеина со стороны остатков аденинов. Межмолекулярных водородных связей между фрагментом polyrA и Cf не обнаружено. Найлены молекулы воды, которые образуют водные мостики и цепочки между донорно-акцепторными группами polyrA. Обнаружены молекулы воды, которые могут стабилизировать комплекс: четыре молекулы воды занимают мостиковые положения между группами NH<sub>2</sub> и N7 двух соседних по цепи аденинов и атомом N9 кофеина.

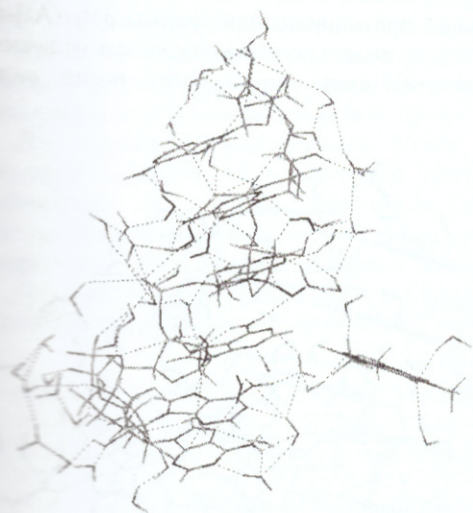


Рис. 18. Комплекс 1. Показаны молекул воды, образующие водородные связи с brA и Cf. Выделены молекулы воды, занимающие мостиковые положения между группами brA (6 молекул воды) и между группами brA и Cf (2 мостика по 2 молекулы воды).

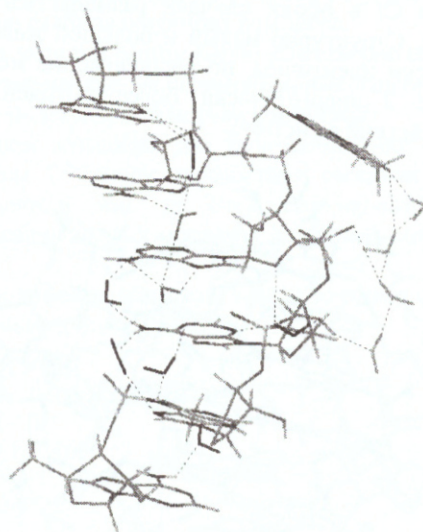
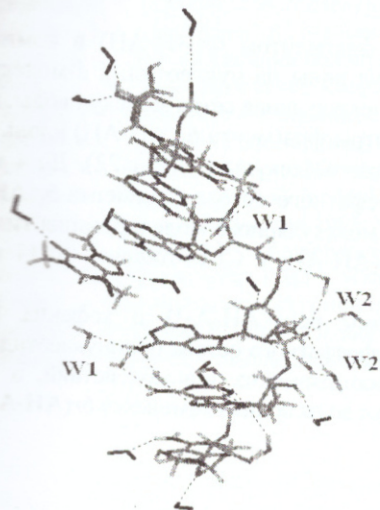


Рис. 19. Комплекс 2. Показаны молекул воды, образующие водородные связи с brA и Cf. Выделены молекулы воды, занимающие мостиковые положения между группами аденинов (7 молекул воды) и между группами brA и Cf (цепочка из 4 молекул воды).

В комплексе 2 молекула Cf располагается вблизи сахарофосфатного остова гексануклеотида (Рис.19). Энергетически этот комплекс несколько выгоднее, чем комплекс 1. Такая предпочтительность определяется взаимодействиями вода-вода и brA - Cf. Взаимодействие и гексануклеотида, и Cf с водой уменьшилось по сравнению с комплексом 1. Очевидно, Cf, располагаясь вблизи фосфатных групп, препятствует их гидратации. В результате уменьшается число молекул воды, образующих водородные связи с фрагментом polyrA (Табл.2, параметры  $U_{SS}$  и  $N_{Hb}$ ). Гидратация Cf практически не изменяется. Найлены молекулы воды, которые занимают (1) мостиковые положения между группами соседних аденинов (атомы N1 и аминогруппы NH<sub>2</sub>) и (2) между группами гексануклеотида (кислороды фосфатных групп) и Cf (C<sub>2</sub>=O<sub>11</sub>). Водные цепочки вблизи сахарофосфатного остова разорваны.



В комплексе 3 Cf частично интеркалирован между двумя соседними аденинами (Рис.20). Сайт интеркаляции был образован на основе рентгеноструктурных данных о возможном угле раскручивания спирали и расхождении соседних оснований таким образом, чтобы расстояние между их плоскостями было порядка 6.8 Å. Водородных связей между группами гексануклеотида и Cf не обнаружено. Энергия взаимодействия вода-комплекс 3 наибольшая (по абсолютной величине) для всех изученных комплексов одноцепочечного фрагмента brA с Cf. То есть частичная интеркаляция Cf вызывает наименьшее нарушение гидратации полинуклеотида, а гидратация Cf практически не изменяется.

Рис. 20. Комплекс 3. Показаны некоторые из молекулы воды, занимающие мостиковые положения между группами аденинов (W1) и между группами сахарофосфатного остова (W2).

Для комплекса 3 найдены водные мостики и цепочки между группами гексануклеотида, но молекул воды, которые могли бы дополнительно стабилизировать комплекс, занимая мостиковые положения между группами гексануклеотида и Cf, не обнаружено.

Необходимо отметить, что для всех исследованных структур получено согласие с экспериментальными данными о гидратации комплексов фрагмент односпиральной polyrA - Cf. Как и в экспериментальных исследованиях, при моделировании систем brA-Cf в водном кластере с комплексом связывается около 9 молекул воды на нуклеотид, из них с фрагментом односпиральной polyrA – 7-8 молекул воды на нуклеотид. С молекулой кофеина водородные связи образуют 3-4 молекулы воды.

Для двухцепочечного фрагмента br(АН-АН) были рассмотрены две структуры комплексов (Рис.21,22). Молекула Cf в обоих случаях размещалась вблизи сахарофосфатного остова, но со стороны разных желобков. Структурно малый и большой желобки двуспиральной протонированной формы polyr(АН-АН) практически идентичны, но расположение молекул кофеина после моделирования несколько отличается. Комплекс 2 энергетически более выгоден. Такая предпочтительность определяется всеми видами взаимодействий в системе.

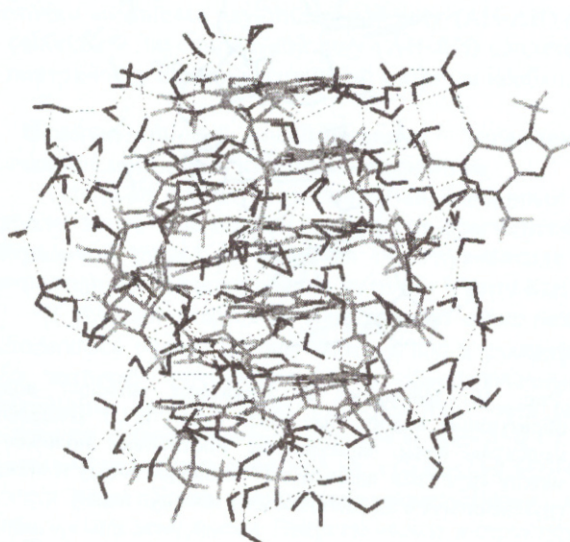


Рис.21. Комплекс 1. Показаны 133 молекулы воды, которые образуют водородные связи с комплексом.



Рис. 22. Комплекс 2. Показаны 114 молекул воды, которые образуют водородные связи с комплексом.

Анализ мгновенных конфигураций позволяет определить число молекул воды, образующих водородные связи с комплексами и их компонентами. Непосредственно с фрагментом br(АН-АН) в комплексе 1 водородные связи образуют 76-78 молекул воды, или 6-7 молекул воды на нуклеотид, а с молекулой Cf связываются 3-4 молекулы воды. Но вблизи комплекса образуется непрерывная сетка молекул воды, которая включает до 133 молекул воды и соединяет гидратно-активные центры фрагмента br(АН-АН) вдоль каждой из цепей и между двумя цепями, а также с двумя карбонильными группами молекулы Cf (Рис.21). До 6 молекул воды занимают мостиковые положения между группами сахарофосфатного остова фрагмента br(АН-АН) и C2=O11, C4=O13 группами Cf.

Для комплекса 2 ситуация аналогична. Непосредственно с фрагментом br(АН-АН) в комплексе 2 водородные связи образуют 79-80 молекул воды, или до 7 молекул воды на нуклеотид, а с молекулой Cf связываются 3-4 молекулы воды. Вблизи комплекса также образуется непрерывная сетка молекул воды, которая включает до 114 молекул воды и соединяет гидратно-активные центры фрагмента br(АН-АН) вдоль каждой из цепей и между двумя цепями, а также с акцепторными группами молекулы Cf (Рис.22). До 4 молекул воды занимают мостиковые положения между группами сахарофосфатного остова фрагмента br(АН-АН) и C2=O11 группой и атомом N9 молекулы Cf. То есть, по данным молекулярного моделирования гидратация двух различных структур комплекса двухцепочечного фрагмента br(АН-АН) с Cf составляет 10-11 молекул воды на нуклеотид.

Таким образом, стабилизация комплекса двуспиральной формы polyr(АН-АН) и кофеина, который образуется по внешнему типу связывания молекулы Cf вблизи сахарофосфатного остова полинуклеотида, может осуществляться в основном за счет Ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий, а также в результате образования водных мостиков и непрерывной сетки молекул воды вблизи комплекса br(АН-АН) с Cf.

## ВЫВОДЫ

На основании анализа результатов экспериментальных исследований (ИК-спектроскопия и пьезогравиметрия) и компьютерного моделирования (метод Монте Карло) комплексов двух структурных форм полирибоадениловой кислоты с кофеином можно сделать следующие выводы.

Присутствие кофеина в системе не изменяет процесс формирования упорядоченной спиральной структуры как односпиральной нейтральной polyA, так и ее двуспиральной протонированной формы. В комплексах односпиральной polyA с Cf обнаружено уменьшение гидратации полинуклеотидной матрицы по сравнению с ее гидратацией в свободном состоянии. При образовании комплексов двуспиральной формы poly(AH-AH) с Cf, наоборот, обнаружено увеличение гидратации по сравнению с гидратацией свободной двуспиральной poly(AH-AH). Показано, что при образовании комплекса двуспиральной poly(AH-AH) с Cf формируется непрерывная сетка молекул воды, дополнительно стабилизирующая комплекс.

Для всех исследованных систем результаты моделирования методом Монте Карло качественно согласуются с экспериментальными результатами. Поэтому, используя все полученные экспериментальные данные и данные компьютерного моделирования, можно предложить следующие молекулярные модели комплексов.

Для комплекса односпиральной формы polyA с кофеином возможны два типа связывания – внешнее связывание молекулы Cf и частичная интеркаляция молекулы Cf между плоскостями соседних аденинов. Стабилизация всех типов комплексов может осуществляться как за счет Ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий, так и в результате образования водных мостиков и цепочек, связывающих донорно-акцепторные группы кофеина и полинуклеотида.

Для комплекса двуспиральной структуры poly(AH-AH) и кофеина возможно только внешнее связывание молекулы Cf вблизи сахарофосфатного остова полинуклеотидной матрицы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nurminen M.L., Niittynen L., Korpela R., Vapaatalo H. // *Eur.J.ClimNutr.* 1999. V.53. P.831-839.
2. Brauer L.H., Buican B., De Wit H. // *Behav.Pharmaco.* 2002. V.5. P.111-118.
3. Sivak A., Rudenko L., Teaque L.G. // *Environ.Mutag.* 1982. V.4. P.143-162.
4. Vexler Z.B., Eidus L.Kh., Vexler A.M. // *Studia biophys.* 1984. V.45. P.157-159.
5. Selby C.P., Sancar A. // *Proceed.Nat.Acad.Sci. USA.* 1990. V.87. P.3522-3525.
6. Tempel K., von Zallinger C. // *Z.Naturforsch.* 1997. V.52. P.466-474.
7. Kan L-S., Borer P.N., Cheng D.M., Ts'o P.O.P. // *Biopolymers.* 1980. V.19. P.1641-1654.
8. Fritzsche H., Lang H., Sprinz H., Pohle W. // *Biophys.Chem.* 1980. V.11. P.121-131.
9. Lang H. // *Studia Biophys.* 1976. V.55. P.137-156.
10. Шестопалова А.В., Стариков Е.Б., Семенов М.А., Большух Т.В. Исследование гидратации кофеина и комплекса ДНК-кофеин во влажных пленках методами ИК-спектроскопии и пьезогравиметрии. Препринт ИРЭ НАНУ №332, 1987, Харьков, 22с.
11. Fritzsche H., Petri I., Schutz H., Weller K., Sedmera R., Lang H. // *Biophys.Chem.* 1980. V.11. P.109-119.
12. Jafari M., Rabbani A. // *Metabolism.* 2004. V.53. P.687-92.
13. Brauer L.H., Buican B., De Wit H. // *Oncogene.* 2003. V.22. P.8283-8292.
14. Marheineke K., Hyrien O. // *J.Biol.Chem.* 2004. V.279. P.28071-28081.
15. Vavrova J., Marekova-Rezacova M., Vokurkova D and oth. // *Radiat.Environ Biophys.* 2003. V.42. P.193-199.
16. Bedher E., Du I., Traganos F., Darzynkiewicz Z. // *Cytometry.* 2001. V.43. P.38-45.
17. Lyles M.B., Cameron I.L. // *Cell Biology International.* 2002. V.26. P.145-154.
18. Johnson I.M., Bhuvan Kumar S.G., Malathi R. // *J.Biomol.Stuc.Dyn.* 2003. V.20. P. 687-692.
19. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Starikov E.B. // *Studia biophysica.* 1985. V.106. P.181-192.
20. Bolbukh T.V., Starikov E.B., Semenov M.A. // *Studia biophysica.* 1985. V.108. P.199-207.
21. Семенов М.А. // *Межвуз.сб. Молекулярная биология и биофизика, КГУ.* 1984. №9. с.25-33
22. Большух Т.В., Семенов М.А., Малеев В.Я., Сечкин В.В. Использование метода кварцевого резонатора для изучения изотерм гидратации полинуклеотидов. Препринт ИРЭ НАНУ №228, Харьков, 1983, 19с.
23. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N. and oth. // *J.Chem.Phys.* 1953. V.21. P.1087-1092.
24. Danilov V.I., Tolokh I.S. // *J.Biomol.Struct.Dyn.* 1990. V.7. P.1167-1183.
25. Danilov V.I. and oth. // *J.Biomol.Struct.Dyn.* 1997. V.15. P.69-80.
26. Danilov V.I. and oth. // *J.Biomol.Struct.Dyn.* 1999. V.16. P.1107-1117.
27. Saenger W., Riecke J., Suck D. // *J.Mol.Biol.* 1975. V.93. P.529-534.
28. Finch J.T., Klug A. // *J.Mol.Biol.* 1969. V.46. P.597-598.
29. Lerner D.B., Kearns D.R. // *Biopolymers.* 1981. V.20. P.803-816.
30. Rich A., Davies D.R., Crick F.H.C., Watson J.D. // *J.Mol.Biol.* 1961. V.3. P.71-86.
31. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: М.: Мир, 1987. 584с.
32. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. and oth. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 5179-5197.
33. Shestopalova A.V. // *Croatica Chem.Acta.* 1989. V.62. P.825- 834.