

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ  
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В УЗНАЮЩЕМ  
КОМПЛЕКСЕ МЕТИЛУРАЦИЛА С АКРИЛАМИДОМ.****И.К. Галетич, С.Г. Степаньян, В.С. Шелковский,  
М.В. Косевич, Ю.П. Благой, Л. Адамович\***

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,  
проспект Ленина, 47, 310164, Харьков, Украина.*

*\* Университет Аризоны, Химический факультет, Тусон, Аризона, 85721 AZ, США.*

Статья поступила 17 мая 1998г.

Определены структурные и энергетические параметры межмолекулярных взаимодействий в модельном узнающем комплексе нуклеинового основания 1-метилурацил с боковыми радикалами аминокислот аспарагина и глутамина. Величина энтальпии образования комплекса  $\Delta H$ , измеренная посредством метода температурно-зависимой ионизационно-полевой масс-спектрометрии, составляет  $(-40,6 \pm 4,2)$  кДж/моль и находится в хорошем согласии со значениями энергии взаимодействия в двух наиболее выгодных конфигурациях димеров, рассчитанных методами **MP2** и **DFT**.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** белково-нуклеиновое узнавание, масс-спектрометрия, ab initio расчеты.

Белково-нуклеиновое узнавание, являющееся важным этапом во многих процессах биорегуляции, активно изучается разнообразными молекулярно-биологическими и биофизическими методами [1,2]. Однако, большинство из этих методов дают информацию преимущественно о структуре узнающих комплексов. Определяемые энергетические параметры относятся, в основном, к суммарному взаимодействию на уровне макромолекул, что не позволяет выделить вклад специфических взаимодействий в узнающих центрах. Для решения последней задачи используется подход экспериментального и теоретического моделирования узнающих центров, включающих небольшое число связанных посредством водородных связей функциональных атомных групп биополимеров [3].

Эффективным методом определения термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий в комплексах мономеров биополимеров является метод температурно-зависимой масс-спектрометрии с полевой ионизацией (ПИ), разработанный во ФТИНТ НАН Украины [4]. Среди теоретических квантово-химических методов моделирования межмолекулярных комплексов наибольшей точностью отличаются неэмпирические методы **DFT** (Density Functional Theory, Теория Функционала плотности) и теория возмущений **MP2** (Moller-Plesset). Целью настоящей работы, продолжающей серию модельных исследований узнающих центров в белково-нуклеиновых комплексах [5-7], явилось изучение структурных и энергетических



параметров комплексов 1-метилурацила ( $m^1\text{Ura}$ ) с акриламидом (Acr), моделирующим боковые радикалы аминокислот аспарагина и глутамина. Для определения энтальпий взаимодействия использовали экспериментальный метод температурно-зависимой ПИ масс-спектрометрии и теоретические методы MP2 и DFT; эти же теоретические методы использовали для установления оптимальной структуры ассоциатов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Экспериментальное определение энтальпии взаимодействия в комплексе  $m^1\text{Ura}$ -Acr проводили с помощью метода температурно-зависимой ПИ масс-спектрометрии. Подробное описание метода можно найти в работах [4,8,9]. Метод основан на построении Вант-Гоффовских графиков, представляющих собой зависимость константы ассоциации  $K_{\text{acc}}$  молекул в газовой фазе от температуры и содержащих исходные данные для расчета энтальпий образования комплексов по формуле:

$$\ln K_{\text{acc}} = -(\Delta H/RT) + \text{const} \quad (1)$$

Ранее было установлено, что ионные токи компонентов реакционной системы (мономеров и продуктов их ассоциации) в ПИ масс-спектрах прямо пропорциональны концентрациям этих компонентов в газовой фазе [10], что позволяет использовать интенсивности соответствующих пиков в масс-спектрах для расчетов  $K_{\text{acc}}$ .

Температура реакционной зоны регулировалась посредством изменения температуры ПИ эмиттера [9]. Анализ условий термодинамического равновесия в используемых экспериментальных условиях проведен в [4,8].

Измерения проводили при помощи секторного магнитного масс-спектрометра МИ 1201 (ПО «Электрон», Сумы, Украина), снабженного лабораторным ПИ источником ионов [4,11]. В работе использовали препараты 1-метилурацила и акриламида производства фирмы «Reanal», Венгрия.

Теоретические квантово-химические расчеты структурных и энергетических параметров димеров проводили методами DFT / B3LYP и MP2 [12-16] с использованием программы GAUSSIAN-94 [17]. На первом этапе проводилась полная оптимизация геометрии димеров на уровне DFT / B3LYP/ 6-31++G<sup>\*\*</sup>. Для найденной по этой процедуре геометрии определяли гармонические частоты для расчета поправок к энергии нулевых колебаний (ZPVE - zero-point vibration energy). Затем геометрия найденных димеров реоптимизировалась методом MP2/6-31+G<sup>\*</sup>. При расчете энергий взаимодействия использовали BSSE (basic set superposition error) поправку.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полевые масс-спектры газофазной системы ( $m^1\text{Ura} + \text{Acr}$ ) содержали пики, соответствующие молекулярным ионам мономеров а также ионам гомо- и гетероассоциатов. Соотношение интенсивностей (I) этих пиков изменялось при постепенном (ступенчатом) изменении температуры реакционной зоны. Константа ассоциации  $K_{\text{acc}}$  рассчитывалась как

$$K_{\text{acc}} = I_{[m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}]} / (I_{[m^1\text{Ura}]} \cdot I_{[\text{Acr}]}) \quad (2)$$

Зависимость  $K_{\text{acc}}$  от температуры (Вант-Гоффовская зависимость) приведена на Рис 1.

Величина энтальпии образования водородно-связанного ассоциата  $m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , рассчитанная по формуле (1), оказалась равной  $40,6 \pm 4,2$  кДж/моль.

Квантово-химические расчеты, проведенные по методам, описанным выше, дали две равновесные структуры (А и В) димера  $m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , приведенные на Рис 2 (а,б).

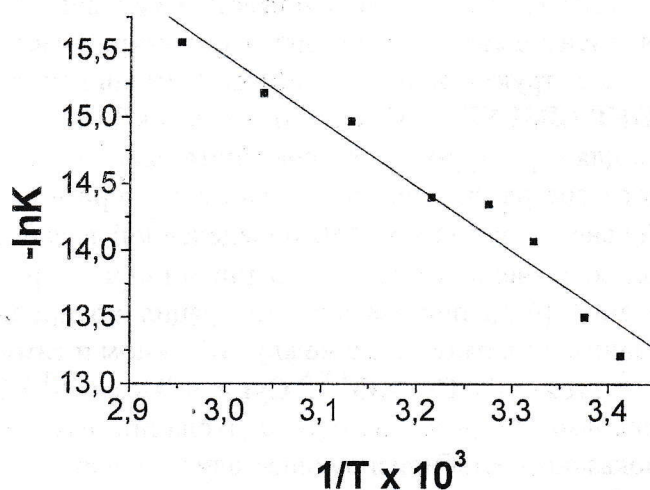


Рисунок 1. Температурная зависимость константы ассоциации  $K_{acc}$  для водородно-связанных димеров  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , определенная на основании данных ПИ масс спектров газофазной реакционной системы ( $m^1 \text{Ura} + \text{Acr}$ ).

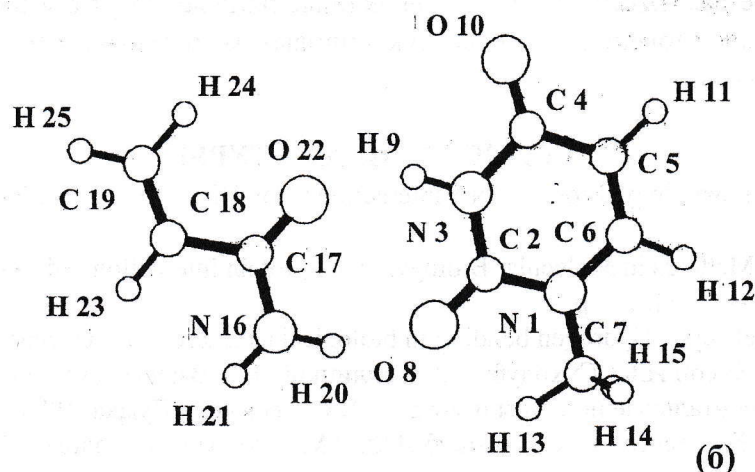
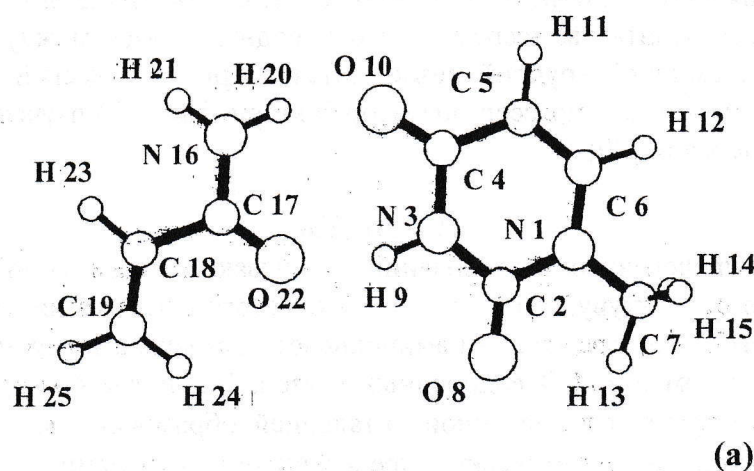
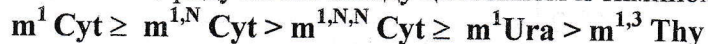


Рисунок 2. Равновесные структуры А и В для димера  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , рассчитанные на уровне  $\text{MP2/6-31+G}^*$  (Геометрические параметры комплексов могут быть получены у авторов. (E-mail: stepanian@ilt.kharkov.ua)



Оба димера имеют планарную структуру и стабилизированы N-H...O водородными связями. Энергия взаимодействия для двух структур имеет близкие значения: (- 52.70) кДж/моль для структуры (а) и (- 47.36) кДж/моль для структуры (б), рассчитанные методом **DFT / B3LYP/ 6-31++G\*\*** и (-51.43) кДж/моль для структуры (а) и (- 47.84) кДж/моль для структуры (б), рассчитанные методом **MP2/6-31+G\***. Наблюдается хорошее согласие рассчитанных энергий с экспериментально определенной величиной  $\Delta H$ . Сравнение величины  $\Delta H$ , определенной в данной работе для комплекса  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Asr}$  со значениями  $\Delta H$ , измеренными в ряде предшествующих работ для других оснований [6,7], показывает, что урацил по прочности связывания с амидной группой занимает в ряду место между цитозином и тиминном:



В работе [18] с использованием модельного подхода при изучении ДНК - белковых взаимодействий показано дестабилизирующее влияние акриламида и глутамина на ДНК, связанное с образованием водородных связей между амидной группой и основаниями ДНК в односпиральных участках. В работе [19] методом ЯМР также было обнаружено взаимодействие амидной группы с основаниями посредством водородной связи в растворителе хлороформе. Это указывает на важное значение амидной группы как элемента белковой структуры и возможность ее непосредственного участия в функционировании белков, расплетающих двойную спираль нуклеиновых кислот. Контакты посредством водородных связей между нуклеиновыми основаниями и амидной группой реализуются в кристаллической структуре специфического комплекса репрессор-оператор бактериофага 434 изученного рентгеноструктурным методом [20].

### ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований показывают, что димер  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Asr}$  имеет планарную структуру; связывание азотистого основания и акриламида (моделирующего боковые радикалы аминокислот аспарагина и глутамина) осуществляется посредством N-H...O водородных связей. Наблюдается хорошее согласие между экспериментально измеренной энтальпией образования комплекса  $\Delta H = (-40,6 \pm 4,2)$  кДж/моль и теоретически определенными энергиями взаимодействия в двух оптимальных конформациях димеров (-51.43) кДж/моль и (- 47.84) кДж/моль (по данным метода **MP2/6-31+G\***). Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях белково-нуклеиновых комплексов в рамках модели точечных контактов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Methods in Enzymology. Protein-DNA interactions. San Diego. Academic Press. 1998. V 208. p. 528.
2. G.G.Kneale. Methods in Molecular Biology. DNA-protein interaction. Ed. Totowa, NJ. The Humana Press. 1994. 148 p.
3. Saenger W., Jeffrey J. Hydrogen bonding in biological structures. Berlin. Springer. 1991. 347p.
4. Веркин Б.И., Янсон И.К., Суходуб Л.Ф., Теплицкий А.Б. Взаимодействия биомолекул. Новые экспериментальные подходы и методы. Киев. Наукова Думка. 1985. 164 с.
5. Теплицкий А.Б., Галетич И.К., Суходуб Л.Ф. // Молекулярная биология. 1990. Т.35, N 5. с. 709 - 710.
6. Poltev V.I., Shulyupina N.V., Bruskov V.I. et al. // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 1991. V. 9, N1. P. 101-111.
7. Галетич И.К., Шелковский В.С., Косевич М.В., Благой Ю.П. // Сборник «Проблемы биологии и медицины». Харьков-Полтава. 1998. с. 75-88.

8. Sukhodub L.F. // Chem. Rev. 1987. V. 87, N3. P. 589-606.
9. Шелковский В.С. // Дис. Канд. физ. - мат.наук. 1985. Харьков. 172 с.
10. Король Э.Н., Лобанов В.В., Назаренко В.А., Покровский В.А. Физические основы полевой масс-спектрометрии. Киев. Наукова Думка. 1978. 195с.
11. Sukhodub L.F., Shelkovsky V.S., Wierzchowski K.L. // Biophys Chem. 1984. V.19. P.191-200
12. Binkley J.S., Pople J.A. // Int. J. Quantum Chem. 1975. V.9. P.229.
13. Pople J.A., Binkley J.S., Seeger R. // Int. J. Quantum Chem. Quantum Chem. Symp. 1976. V10. P.1
14. Becke A.D. // Phys. Rev. B 1988. V 38. P.3098.
15. Lee C., Yang W., Parr R.G. // Phys. Rev. B 1988. V.37. P.785.
16. Vosko S.H., Wilk L., Nusair M. // Can. J. Phys. 1980. V.58. P.553.
17. Frish M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et. al. *Gaussian 94, Revision E.2*; Gaussian Inc. Pittsburgh. PA. 1994.
18. Смолянинова Т.И., Брусков В.И., Кашпарова Е.В. // Молекулярная биология. 1985. Т.19, N4. с. 992-1000.
19. Helene C., Lancelot G. // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1982. 39. P.1- 68.
20. Anderson J.E., Ptashne M., Harrison S.C. // Nature.- 1987.- V.326.- P. 846-852.