

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.32

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ МЕТОДОМ МОНТЕ КАРЛО. 2. ВЛИЯНИЕ ПРОТОНИРОВАНИЯ НА ГИДРАТАЦИЮ АССОЦИАТОВ ЦИТОЗИНА.

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

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 310085, Харьков;
*Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077, Харьков

Статья поступила в редакцию 20 октября 1999 г.

Методом Монте Карло изучены процессы ассоциации нейтральной и протонированной по N3 положению форм цитозина в воде и влияние протонирования на взаимодействие ассоциатов цитозина с водным окружением. Получены энергетические и структурные характеристики систем, содержащих водородносвязанную (BC-) пару нейтрального (C) и протонированного (C⁺) цитозина, стэкинг-димеры обеих форм цитозина и 200 молекул воды. Показано, что образование BC-пары в воде энергетически невыгодно, а в вакууме такая пара стабильна. Образование стэкинг-димеров C-C и C⁺-C⁺ в воде энергетически выгодно. Энергетическая предпочтительность образования стэкинг-димера C-C в воде обусловлена как взаимодействием димер-вода, так и энергетически выгодным изменением структуры воды при образовании стэкинг-димера из двух изолированных цитозинов. Энергетическая предпочтительность формирования стэкинг-димера C⁺-C⁺ в воде определяется сильным взаимодействием димер-вода и образованием водных мостиков между цитозинами, которые стабилизируют такой ассоциат. Определены схемы гидратации трех ассоциатов

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ассоциаты цитозина, протонирование, гидратация, метод Монте Карло.

Изучение влияния протонирования цитозина по N3 положению на взаимодействие его ассоциатов - водородносвязанных (BC-) пар и стэкинг-димеров - с водным окружением является следующим этапом при исследовании нами роли воды в стабилизации различных структурных форм полирибозитидиловой кислоты (polyrC) [1-3].

Известно, что в водных растворах polyrC образует несколько структурных форм, определяемых внешними условиями, в частности, pH. В нейтральных и слабощелочных растворах polyrC находится в односпиральной форме [4], в области $3.7 < \text{pH} < 5.5$ - в двухспиральной, а при $\text{pH} < 3.5$ - в полностью протонированной, разупорядоченной форме [5]. Стабилизацию односпиральной структуры объясняют наличием стэкинга между соседними цитозинами, расположенными вдоль цепи polyrC, и водородными связями (BC), возникающими между гидроксильными группами C2'OH рибозы [4,6], а стабилизацию двойной спирали полупротонированной формы polyrC - образованием трех BC между цитозинами двух соседних цепей [5]. Недавние исследования показали, что существенную роль в стабилизации различных структурных форм polyrC играет взаимодействие с водным окружением, и стабилизация достигается при связывании 10-12 молекул воды на нуклеотид для односпиральной формы и не менее 9 молекул воды на нуклеотид для двухспиральной формы [1,3]. Методами ИК спектроскопии и пьезограмметрии определены гидратноактивные центры и степень гидратации polyrC, предложена возможная схема локализации молекул воды в двухспиральном комплексе polyrC - polyrC⁺. Но энергетические и структурные изменения водного окружения polyrC и ее компонентов, возникающие при протонировании цитозина, не изучались.

Заслуживает внимания и исследование ассоциации в водном растворе нейтральной и протонированной форм цитозина с образованием основных структурных компонентов polyrC - BC-пар двух цитозинов, образующих три BC и определяющих межцепочечные взаимодействия в polyrC - polyrC⁺, а также стэкинг-димеров нейтрального и протонированного цитозинов, ответственных за внутрицепочечные взаимодействия polyrC. В течение многих лет общепринятым было мнение, что стабильность двойных спиралей нуклеиновых кислот в воде определяется не столько водородным связыванием, сколько стэкинг-взаимодействиями оснований. Это мнение основывалось на результатах исследований, доказавших предпочтительность формирования BC-пар в вакууме и их нестабильность в водном растворе и, наоборот, энергетическую выгодность образования стэкинг-ассоциатов оснований в воде и их нестабильность в вакууме и неполярных растворителях [7-10]. Процессы ассоциации двух форм

цитозина могут отличаться от процессов ассоциации оснований нуклеиновых кислот тем, что ассоциаты образуются между нейтральной молекулой цитозина и ее молекулярным ионом. Поэтому изучение ассоциации различных форм цитозина в водном растворе может расширить представления о роли воды в формировании и стабилизации ассоциатов производных оснований нуклеиновых кислот.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы было изучение влияния протонирования цитозина по N3-положению на процессы его ассоциации в воде с образованием ВС-пары $C...C^+$ и двух типов стэкинг-димеров нейтральной (C-C) и протонированной (C^+-C^+) форм цитозина и их гидратацию. Для описания таких процессов необходимо получить энергетические и структурные характеристики систем, содержащих изучаемые соединения и молекулы воды. Как и на предыдущем этапе при изучении влияния протонирования на гидратацию мономеров цитозина [2], для решения поставленной задачи нами использовался метод Монте Карло. Применение метода Монте Карло для изучения процессов ассоциации биомолекул подробно описано в работах [9,10].

Координаты плоской пары с тремя ВС взяты из работы [11], а координаты стэкинг-димера нейтрального цитозина - из рентгеноструктурных данных для односпиральной непротонированной polyrC [4]. Координаты стэкинг-димера протонированного цитозина определены из расположения цитозинов в цепи двухспиральной полупротонированной polyrC - polyrC⁺, построенной нами с помощью программ молекулярного моделирования. Положение цитозинов в ассоциатах в процессе расчетов не изменялось. Расчеты проводились в сферах радиуса 22 Å при температуре 298К с последующим уточнением положения молекул воды вблизи центров гидратации при 5К. Для расчетов энергии взаимодействия вода-ассоциат и цитозин-цитозин в ассоциате использовался модифицированный потенциал Леннарда-Джонса 1-6-12 с параметрами, полученными Полтевым и соавторами [12], а для расчетов взаимодействий вода-вода - полуэмпирический потенциал 1-6- \exp [13]. Протонирование учитывалось посредством модификации частичных атомных зарядов, рассчитанных *ab initio* с использованием метода MP2 (Moller-Plesset) / 6-31G* [11,14].

При установлении равновесного состояния каждой системы длина генерируемой марковской цепи составляла 4.000.000 элементарных конфигураций. На стационарном участке, при вычислении средних значений энергетических характеристик и функций распределения, генерировались 4.000.000 элементарных конфигураций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния протонирования на гидратацию различных компонентов polyrC нами получены энергетические и структурные характеристики систем, содержащих ВС-пару нейтрального и протонированного цитозинов ($C...C^+$) (рис.1), стэкинг-димеры нейтрального (C-C) (рис.3) и протонированного цитозина (C^+-C^+) (рис.4) в кластере из 200 молекул воды.

Энергетические характеристики исследованных систем представлены в таблице 1. 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 основание-основание, $U_{ww/1}$ и $U_{sum/1}$ - удельные значения энергий взаимодействия вода-вода и полной энергии систем, n_{BC} - число ВС, приходящихся на одну молекулу воды в кластере (показатель структурированности растворителя), N_{BC} - число молекул воды, образующих ВС с ассоциатом.

Таблица 1. Энергетические и структурные характеристики ассоциатов цитозина с различной геометрией в кластере из 200 молекул воды.

Система	U_{sum} ккал/моль	U_{ww} ккал/моль	U_{wb1}, U_{wb2} ккал/моль	U_{bb} ккал/моль	$U_{sum/1}$ ккал/моль	$U_{ww/1}$ ккал/моль	n_{BC}	N_{BC}
$C...C^+$	-1702.0	-1468.0	-86.6 -129.9	-17.6	-8.51	-7.34	1.74	5,9: 12 2 мостика
C-C	-1788.4	-1575.6	-129.8 -139.1	1.0	-8.94	-7.58	1.75	5,5: 10 0 мостиков
C^+-C^+	-1814.6	-1438.8	-212.1 -209.1	37.4	-9.07	-7.15	1.73	14,12: 20 6 мостиков

Наиболее стабильной является система $C^+-C^++H_2O$. Значения U_{wb} показывают, что более низкая потенциальная энергия этой системы связана с увеличением взаимодействия вода-димер C^+-C^+ по сравнению с такими взаимодействиями в системах $C...C^++H_2O$ и $C-C+H_2O$, хотя взаимодействие

Изучение гидратации различных структурных форм...

протонированных цитозинов сильно дестабилизирует стопку. Сравнение величин U_{ww} для трех ассоциатов указывает на то, что структура растворителя наименее разрушена у системы $C-C+H_2O$.

Данные таблицы 1 позволяют вычислить изменение энергии ассоциации оснований в воде с образованием ВС-пары и стэкинг-димера, которое можно записать в виде:

$$\Delta U = \Delta U_{ww} + \Delta U_{wb} + \Delta U_{bb};$$

где слагаемые для ВС-пары $C...C^+$ рассчитываются как [10]:

$$\begin{aligned} \Delta U_{ww} &= N[(U_{ww/1}(bp) - U_{ww/1}(H_2O)) - ((U_{ww/1}(b1) - U_{ww/1}(H_2O)) + (U_{ww/1}(b2) + U_{ww/1}(H_2O)))]]; \\ \Delta U_{wb} &= N[U_{wb}(bp) - (U_{wb}(b1) + U_{wb}(b2))]; \quad \Delta U_{bb} = U_{bb}, \end{aligned}$$

а для стэкинг-димеров цитозина как [9]:

$$\begin{aligned} \Delta U_{ww} &= N[(U_{ww/1}(D) - U_{ww/1}(H_2O)) - 2(U_{ww/1}(M) - U_{ww/1}(H_2O))]; \\ \Delta U_{wb} &= U_{wb}(D) - 2 U_{wb}(M); \quad \Delta U_{bb} = U_{bb}. \end{aligned}$$

Здесь N - число молекул воды в системе; bp - система $C...C^+ + H_2O$, $b1$ - система $C + H_2O$, $b2$ - система $C^+ + H_2O$, D - система "димер + H_2O "; M - система "мономер + H_2O "; H_2O - система "чистая H_2O ". Результаты расчетов энергетических характеристик реакций ассоциации нейтральной и протонированной форм цитозина приведены в таблице 2. Данные для систем, содержащих мономеры C и C^+ и «чистую» воду, рассчитаны нами ранее [2].

Таблица 2. Энергетические характеристики реакции ассоциации нейтральной и протонированной форм цитозина в воде.

Система	ΔU_{ww} , ккал/моль	ΔU_{wb} , ккал/моль	ΔU_{bb} , ккал/моль	ΔU , ккал/моль
$C...C^+$	34.0	-14.5	-17.6	1.9
$C-C$	-14.0	-79.7	1.0	-92.7
C^+-C^+	80.0	-206.4	37.4	-89.0

Из данных, представленных в табл.2, следует, что образование стэкинг-димеров цитозина из его изолированных мономеров в воде энергетически выгодно, а ВС-пары - невыгодно. В случае стэкинг-димера нейтрального цитозина факторами, стабилизирующими такой ассоциат, являются как энергетически выгодное изменение структуры воды вокруг двух мономеров при их ассоциации в стопку, так и изменение взаимодействия молекул воды с цитозинами. При этом взаимодействие цитозинов между собой (стэкинг-взаимодействие) дестабилизирует ассоциат.

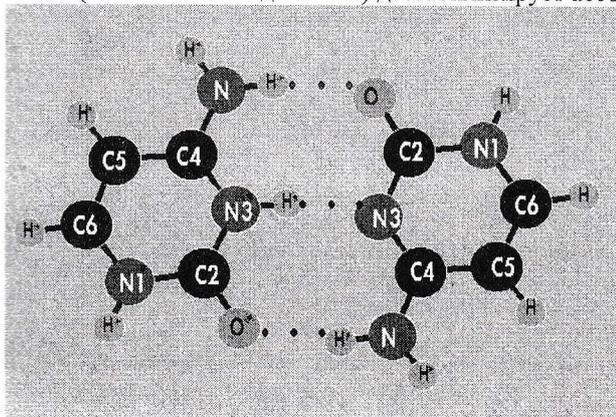


Рис.1. Конфигурация пары $C...C^+$.

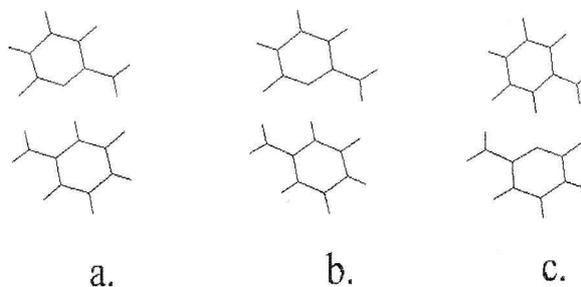


Рис.2. Конфигурации пары $C...C^+$: а. стартовая в вакууме; б. наиболее выгодная конфигурация в вакууме; с. равновесная конфигурация в воде.

В случае ВС-пары образование ее в воде из двух мономеров энергетически невыгодно: взаимодействие вода-вода дестабилизирует образование такой пары, что согласуется с данными о большем разрушении структуры воды в случае образования пар оснований по сравнению с образованием

их стэкинг-ассоциатов в воде [9,10]. При этом стабилизация пары $C...C^+$ осуществляется двумя типами взаимодействия - взаимодействием между цитозинами с образованием трех ВС и взаимодействием цитозинов с молекулами растворителя. Эти два типа взаимодействия значительно более «сильные» в случае образования пары «нейтральная молекула (C) - молекулярный ион (C^+)» по сравнению с обычными парами оснований, входящими в состав нуклеиновых кислот. Наличие у такого ассоциата заряда +1, делокализованного на C^+ , существенно влияет на водное окружение, вызывая переориентацию молекул воды и увеличение числа ВС, образуемых между цитозинами и молекулами воды. Выполненные нами расчеты устойчивости всех трех видов ассоциатов в вакууме методом Монте Карло показали, что ВС-пара в вакууме стабильна (рис.2), тогда как стэкинг-ассоциаты в вакууме неустойчивы (рис. 3,4).

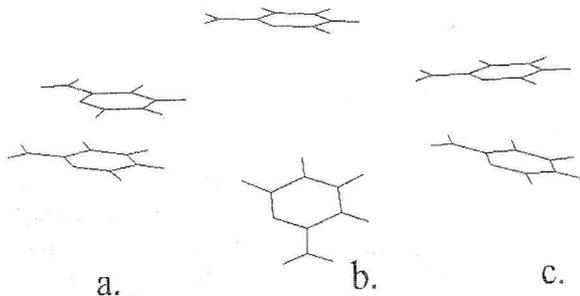


Рис.3. Конфигурации димера C-C: а. стартовая в вакууме; б. наиболее выгодная конфигурация в вакууме; с. равновесная конфигурация в воде.

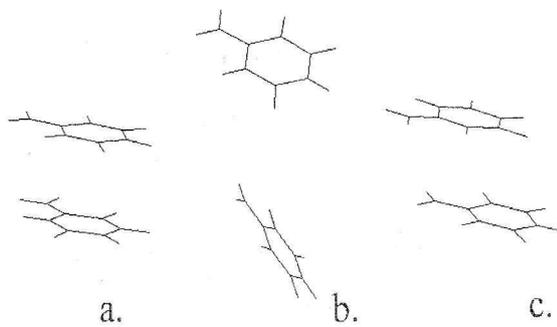


Рис.4. Конфигурации димера C^+-C^+ : а. стартовая в вакууме; б. Наиболее выгодная конфигурация в вакууме; с. равновесная конфигурация в воде.

При образовании стэкинг-димеров двух протонированных цитозинов заряд ассоциата равен +2, что вызывает значительное усиление взаимодействия вода-димер. Из-за увеличения числа ВС молекул воды с ассоциатом C^+-C^+ , приводящего к разрушению упорядоченной структуры водного кластера, взаимодействие вода- C^+ и вода-вода становятся конкурентными, так что изменение последнего является дестабилизирующим фактором при ассоциации двух протонированных цитозинов в стопку. Образование водных мостиков между цитозинами служит дополнительным фактором, повышающим устойчивость стэкинг-димера C^+-C^+ . Даже сильно дестабилизирующее димер стэкинг-взаимодействие между цитозинами не приводит к «развалу» стопки.

О различном разрушении структуры воды у трех изученных систем можно судить и по радиальным функциям распределения, приведенным на рис.5. В случае системы, содержащей димер C-C, наблюдается наименьшее разрушение структуры молекул воды g_0 для системы C-C (рис.4а) подтверждает такой вывод. Структура воды у двух других систем, содержащих $C...C^+$ и C^+-C^+ , разрушена больше.

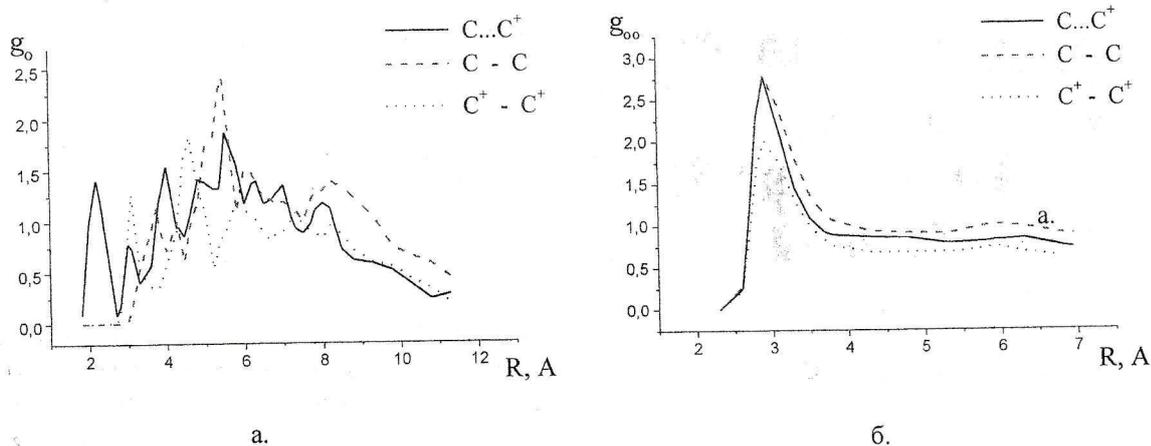


Рис.5. Графики функции g_0 (а) и g_{00} (б) для ассоциатов цитозина.

Изучение гидратации различных структурных форм...

Протяженность первой гидратной оболочки можно определить по положению первого минимума функции g_o , а при интегрировании получить число молекул воды, ее образующих. Для системы $C...C^++H_2O$ можно рассматривать первую гидратную оболочку в пределах 2.7 - 4.4 Å, ее образуют ~ 6 - 7 молекул воды (рис.5а). Положение первого максимума функции g_o связывают с образованием ВС между гидрофильными группами основания и молекулами воды. По положению второго максимума определяют вторую гидратную оболочку, в которой молекулы воды, не попавшие в первую гидратную оболочку, формируют упорядоченный слой молекул растворителя [15]. В случае системы $C...C^++H_2O$ вторую гидратную оболочку можно рассматривать в пределах 5.5 - 7.55 Å с входящими в нее ~ 40 молекулами воды.

Первый минимум функции g_o стэкинг-димера С-С расположен на расстоянии 4.45 Å, определяемая им первая гидратная оболочка димера С-С содержит ~7 молекул воды. Вторая гидратная оболочка расположена в пределах 5.45 - 7.5 Å и состоит из ~54 молекул воды.

Для стэкинг-димера C^+-C^+ первая гидратная оболочка имеет протяженность в пределах 3.3 - 3.4 Å и содержит ~ 2-3 молекулы воды, а вторая гидратная оболочка, имеющая границу 5.15 Å, состоит из ~15 молекул воды. То есть, наиболее упорядоченная структура растворителя может формироваться вблизи стэкинг-димера С-С, тогда как ВС-пара $C...C^+$ и, особенно, стэкинг-димер C^+-C^+ , разрушают структуру воды вблизи себя, вызывая переориентацию молекул воды с образованием ВС с цитозинами, входящими в состав ассоциатов, или "выталкивая" молекулы воды в более дальние слои.

По значениям функции g_{oo} можно судить об относительной средней плотности молекул воды в изученных системах (рис.5в). Как видно из представленных графиков, в системах $C...C^++H_2O$ и $C-C+H_2O$ плотности растворителя практически не отличаются, а в системе $C^+-C^++H_2O$ плотность воды несколько ниже, особенно в близких к стэкинг-димеру слоях. Эти результаты подтверждают вывод о более сильном разрушении структуры воды в системе, содержащей стэкинг-димер C^+-C^+ .

Анализ равновесных мгновенных конфигураций позволил определить точки гидратации всех изученных ассоциатов. Для пары $C...C^+$ ВС образуются с 12 молекулами воды, из них 5 приходится на С, 9 - на C^+ , при этом 2 молекулы воды занимают мостиковое положение между цитозинами. Число мест гидратации отличается от их числа, определенного для изолированных мономеров С и C^+ , и равных 4 и 5, соответственно [10]. Такое изменение числа точек гидратации означает появление дополнительных точек гидратации. У нейтрального цитозина в паре $C...C^+$ центрами гидратации являются группы N1H, C2=O и C6-H, образующие ВС с 3, 1 и 1 молекулами воды, соответственно. Для протонированного основания ВС с 9 молекулами воды образовали группы N1H (2 молекулы H_2O), C2=O (3 молекулы H_2O), N3H (2 молекулы H_2O), а также группы C5H и C6H (по 1 молекуле H_2O). В системе обнаружены две молекулы воды, образующие мостик между основаниями, связывая атом О группы C2=O нейтрального цитозина с группами N3H и NH_2 протонированного. Эти молекулы воды лежат вне плоскости пары, располагаясь над и под группами, образующими ВС между основаниями (рис. 6).

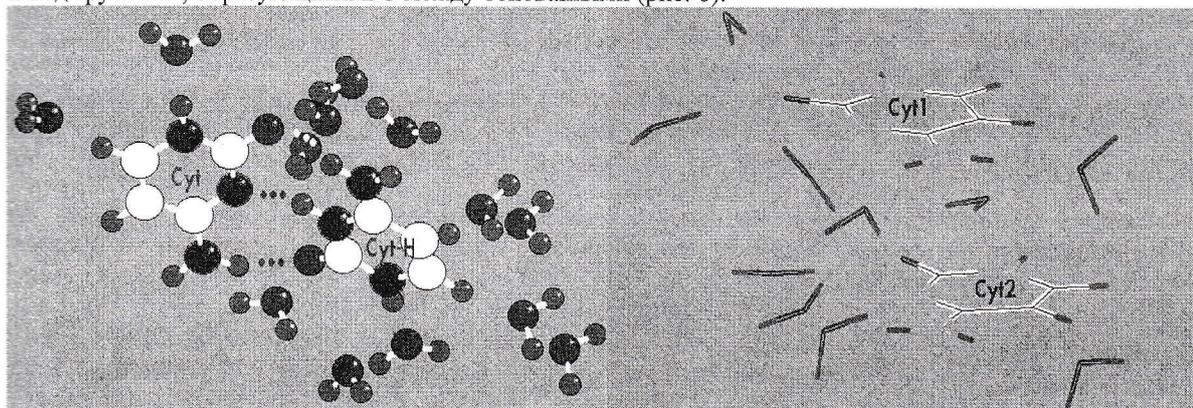


Рис.6. Равновесная конфигурация ВС-пары $C...C^+$ и молекулы воды, образующие с ней ВС.

Рис.7. Равновесная конфигурация стэкинг-димера С-С и молекулы воды, образующие с ним ВС.

Основной вклад в энергию взаимодействия стэкинг-димера С-С с водой вносят 10 молекул H_2O , образующих по 5 ВС с каждым цитозином. С группами N1H и N3 каждого цитозина в димере связываются по одной, а с группами C2=O и NH_2 - по две молекулы H_2O . Для системы $C-C+H_2O$ не обнаружены молекулы воды, занимающие мостиковое положение между группами двух различных цитозинов (рис. 7).

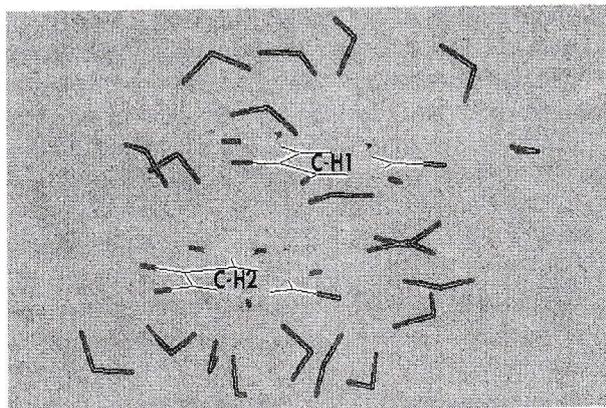


Рис.8. Равновесная конфигурация стэкинг-димера C^+-C^- и молекулы воды, образующие с ним ВС.

В системе, содержащей димер C^+-C^- , 14 молекул воды образуют ВС с первым основанием (это $N1H - 2 H_2O$, $C_2=O - 2 H_2O$, $N3H - 2 H_2O$, $NH_2 - 4 H_2O$, $C5H$ и $C6H$ - по 2 H_2O), 12 молекул воды - со вторым основанием ($N1H - 2 H_2O$, $C_2=O - 2 H_2O$, $N3H - 2 H_2O$, $NH_2 - 4 H_2O$, $C5H$ и $C6H$ - по 1 H_2O), при этом 6 молекул воды занимают мостиковые положения между $N3H$, NH_2 и $C_2=O$ группами цитозинов, образующих стэкинг-димер C^+-C^- (рис.8).

ВЫВОДЫ

Методом Монте-Карло определены энергетические и структурные характеристики и схемы гидратации трех систем, содержащих ассоциаты нейтрального и протонированного цитозина и показано, что:

1. Образование ВС-пары нейтральной и протонированной форм цитозина в воде энергетически невыгодно. Три ВС между основаниями и взаимодействие их с молекулами воды стабилизируют пару, но изменение структуры воды при образовании пары из двух изолированных мономеров энергетически невыгодно. В вакууме ВС-пара стабильна.
2. Образование стэкинг-ассоциатов нейтральной и протонированной форм цитозина в воде энергетически выгодно, а в вакууме они нестабильны.
3. Факторами, стабилизирующим стэкинг-ассоциаты оснований, являются изменение взаимодействия молекул воды с основаниями при образовании димера, а в случае нейтрального цитозина - и энергетически выгодное изменение структуры воды при переходе от мономерной к ассоциированной форме.
4. Стэкинг-димер протонированной формы цитозина в водном растворе энергетически более стабилен, чем стэкинг-димер нейтральной формы цитозина за счет образования большего числа водородных связей с молекулами воды и водных мостиков, тогда как собственно межплоскостные взаимодействия оснований в стопке дестабилизируют стэкинг-димеры.
5. В рассмотренных системах при переходе от более простых систем (мономеры) к более сложным (димеры) число молекул воды, образующих ВС с отдельными мономерами в ассоциатах, возрастает несмотря на уменьшение доступности гидрофильных участков молекул цитозина при их ассоциации.

Список литературы

1. Семенов М.А., Стариков Е.Б., Бельбух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика, 1989, т.34, № 3, с.38-46.
2. Шестопалова А.В., Анищенко В.Д., Малеев В.Я. // Вісник ХДУ №450, Біофізичний вісник, 1999, №2, с.17-22.
3. Maleev V. Ya. and oth. // Spectroscopy of biological molecules: new directions, Abs.8th Eur. Conf., 29 Aug.-9 Sept. 1999, The Netherlands, p.227-228.
4. Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A.G.W. // J.Mol.Biol., 1976, v.106, p.735-748.
5. Chou C.H., Thomas G.J. // Biopolymers, 1977, v.16, N5, p.765-775.
6. Egli M., Portman S., Usman N. // Biochemistry, 1996, v.35, N 26, p.8489-8494.
7. Ts'o P.O.P. // Basic Principles in Nucleic Acids Chemistry, Ed., Ts'o P.O.P., New York; London: Acad. Press, 1974, v.1, p.453-584.
8. Yanson I.K., Teplitsky A.B., Sukhodub L.F. // Biopolymers, 1979, v.18, N 11, p.1149-1170.
9. Danilov V.I., Tolokh I.S. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1990, v.7, N 5, p.1167-1183.
10. Danilov V.I. and oth. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1997, v.15, N 1, p.69-80.
11. Spomer J., Leszczynski J., Vetterl V., Hobza P. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1996, v.13, N.4, p.695-706.
12. Poltev V.I. and oth. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1998, v.16, N 2, p.289-300.
13. Poltev V.I., Groklina T.I., Malenkov G.G. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1984, v.2, N 3, p.413-429.
14. Florian J., Baumruk V., Leszczynski J. // J.Phys.Chem., 1996, v.100, N 13, p.5578-5589.
15. Kulinska K., Kulinski T., Stawinski J., Laaksonen A. // J.Biomol.Struct.Dyn., 1998, v.15, N 5, p. 987-998.