

Механізм взаємодії N1-глікозидів 6-азацитозину з каталітичним сайтом ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7: модельне квантово-хімічне дослідження

Л. Г. Пальчиковська, М. О. Платонов, І. В. Алексєєва, А. Д. Швед

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua

Неемпіричним методом квантової хімії на рівні теорії HF/6-31G(d, p) вперше зафіксовано значне збільшення величини заряду атома N6 азануклеозидів у моделі каталітичного сайту ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7. Блокування іона Mg^{2+} додатковою взаємодією з атомом азоту N6 в комплексі азануклеозид—метал—Туг639 знижує швидкість елонгації, що експериментально підтверджено істотним зменшенням кількості синтезованої РНК за одиницю часу.

Ключові слова: ДНК-залежна РНК-полімераза фага T7, азануклеозиди, N1-глікозиди 6-азацитозину.

Вступ. У наших попередніх експериментах виявлено здатність глікозидних аналогів 6-азацитозину (6-АС, N1- β -D-рибозид 6-азацитозину) біоізостера природного цитидину [1, 2], модулювати продуктивність модельної системи транскрипції *in vitro* із залученням ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7 та їхню цитотоксичну дію на пухлинних лініях клітин [1]. Обидва ефекти обумовлені відмінностями у структурах цукрових фрагментів низки синтезованих аналогів. З-поміж сполук, що пройшли біотестування, найефективнішим (у 4—7 разів активнішим, ніж 6-АС) виявився N1- β -D-ксилозид 6-азацитозину, принципова відмінність структури якого полягає у просторовій конверсії (ротації) 3'-гідроксильної групи цукрового залишку порівняно з рибофуранозидом.

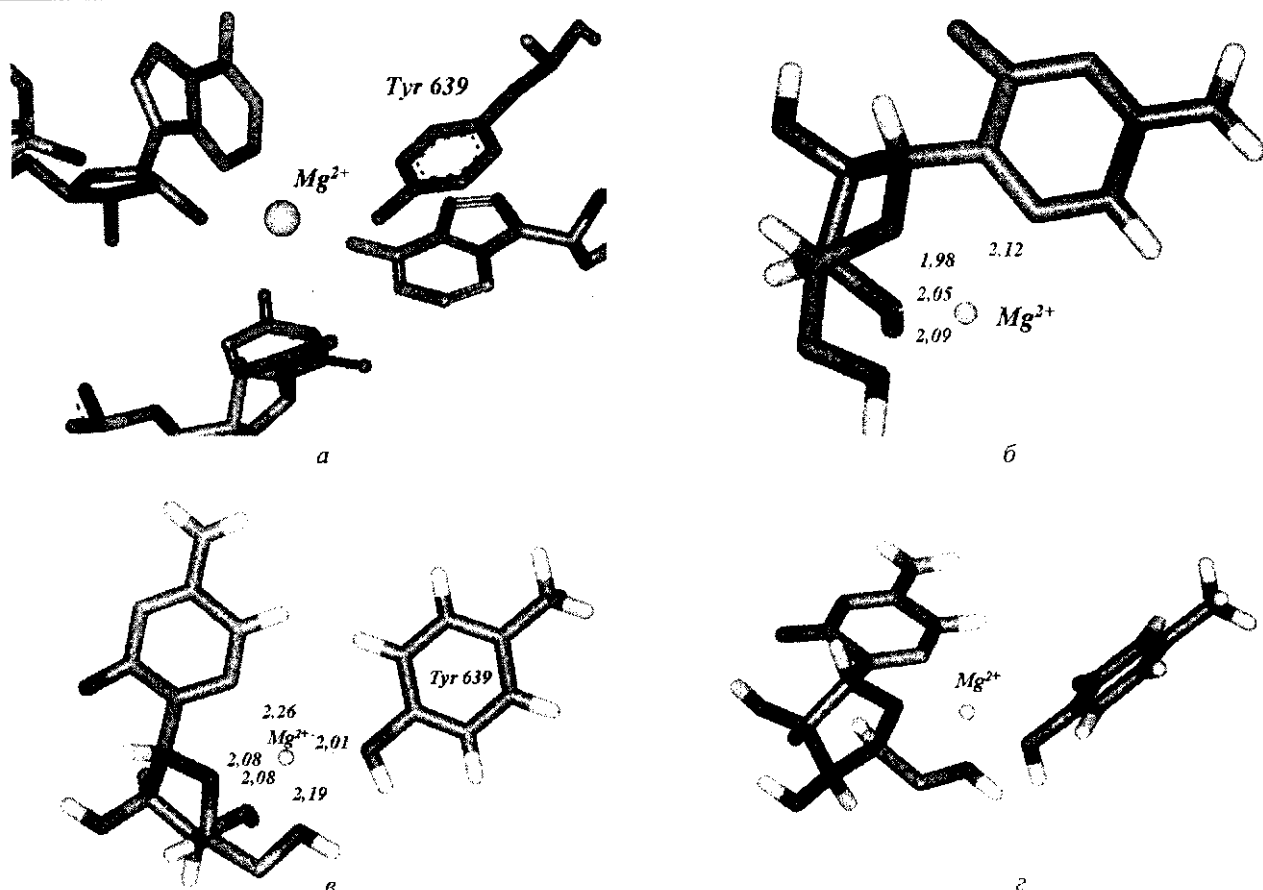
Мета цього дослідження — квантово-хімічне моделювання поведінки згаданих азануклеозидів у каталітичному сайті РНК-полімерази фага T7.

Матеріали і методи. Всі розрахунки виконано за допомогою програмного пакету GAMESS (US) (Granovsky A. A. [www http://classic.chem.msu.su/g-gap/game/ess/index.html](http://classic.chem.msu.su/g-gap/game/ess/index.html), [5]) на високопродуктивному кластері інформаційно-обчислювального центру Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Розрахунок геометричних та енергетичних характеристик зроблено на рівні теорії HF/6-31G(d, p).

Результати і обговорення. Характерною особливістю аномального нуклеозиду 6-АС у вільному стані є наявність специфічних міцних внутрішньомолекулярних водневих зв'язків. Вперше це було показано вичерпним конформаційним аналізом, проведеним неемпіричним квантово-хімічним методом *ab initio* на рівні теорії MP2/6-31++G (d, p)//MP2/6-31G(d, p) [3].

Поведінку досліджуваних азануклеозидів у ферментативних системах обумовлюють висока подібність триазинової основи до канонічного цитозину; природна нежорсткість і конформаційна рухливість цукрового фрагмента; можливість утворен-

© Л. Г. ПАЛЬЧИКОВСЬКА, М. О. ПЛАТОНОВ, І. В. АЛЕКСЄЄВА, А. Д. ШВЕД, 2005



Просторові структури комплексів Mg^{2+} з: а — Tyr і трьома нуклеозидами (PDB файл 1SOV); б — ксилозидам 6-азацитозину; в — ксилозидам 6-азацитозину та Tyr; г — рибозидам 6-азацитозину (б—г — розрахунки виконано за даними неемпіричних квантово-хімічних розрахунків на рівні теорії HF/6-31G(d, p))

ня водневих зв'язків з донорсько-акцепторними центрами найближчого білкового оточення, у тому числі, імовірно, з іонами металів.

За даними авторів роботи [4], двовалентний іон Mg^{2+} , який перебуває в каталітичному центрі РНК-роІ, не лише безпосередньо бере участь у каталітичному акті процесу елонгації ланцюга РНК, але і, як стверджують автори, втручається в механізм відбору ферментом відповідного цукру: він утворює зв'язок з гідроксильною групою у положенні 2' рибози та ОН-групою Tyr639, що відіграє ключову роль у виборі цукру з рибонконфігурацією гідроксилу у положенні 2'.

Для моделювання поведінки досліджуваних нуклеозидів у каталітичному сайті полімеразного комплексу ми використали PDB файл (ISOV) з роботи [4] та виділили в ньому область радіусом 5 Å, до якої увійшли: іон магнію, амінокислотні залишки Tyr639, Ala638, Leu638, Thr636, Met635, ділянка матриці з двох нуклеотидів та черговий

нуклеозидтрифосфат АТФ (рисунок, а). Змінюючи послідовно АТФ на ксилонуклеозид, а потім на рибонуклеозид ми створили модельну систему для подальших розрахунків.

Конформаційний пошук для ксилозида 6-азацитозину, проведений у силовому полі MMFF, довів, що положення гетероциклу у модельній системі майже не змінюється. Що ж стосується цукрового залишку, то він, маючи свободу обертання навколо глікозидного зв'язку С-Н, утворює координаційні зв'язки з іоном Mg^{2+} , які і стабілізують положення азануклеозиду в системі.

Розрахунок створеної модельної композиції здійснювали в пакеті GAMESS (US) [5] у базисі HF/6-31G(d, p), поступово збільшуючи число учасників взаємодії.

На першому етапі розрахунків оптимізовано геометрію пари Mg^{2+} —ксилозид 6-азацитозину (рисунок, б). В отриманому комплексі іон Mg^{2+} координований між атомами O3', O4', O5' та N6

азануклеозиду на відстані відповідно 2,05; 1,99; 2,09 і 2,12 Å. Необхідно підкреслити, що величини зарядів на атомах азоту N3 і N6 гетероциклічної основи при такій конфігурації комплексу змінюються і становлять 0,643 і 0,418 e відповідно порівняно з розподілом зарядів в молекулі у вільному стані (0,689 і 0,053 e). Якщо до системи долучити молекулу тирозину, то іон Mg^{2+} координується між атомами O3', O4', O5' і N6 ксиліозиду та гідроксилом тирозину на відстанях 2,08; 2,08; 2,19; 2,26 і 2,01 Å відповідно. У такій композиції ароматичне кільце тирозину і гетероцикл 6-азацитозину є планарними і лежать майже в одній площині (рисунок, в).

При заміні ксиліозиду 6-азацитозину на його рибозид ми отримали іншу картину (рисунок, г): координація іона Mg^{2+} в утвореному комплексі з рибофуранозидом здійснюється по чотирьох центрах — O4', O5' рибози, N6 основи та OH тирозину, а не п'яти, як у попередньому випадку, оскільки атом O3' цукрового фрагмента виключений з комплексоутворення. Площини ароматичних кілець основи і тирозину розміщуються під кутом одна до одної (рисунок, г).

Таким чином, неемпіричними методами квантової хімії на модельній ділянці каталітичного сайту РНК-полімерази фага Т7 вперше виявлено, що азануклеозиди можуть втручатися у механізм відбору «правильного» субстрату. Низка потужних координаційних зв'язків іона Mg^{2+} з азануклеозидом і OH групою Tug639 перешкоджають та значно ускладнюють як упізнання субстрату, так і подальшу участь металу в каталітичному акті. Це має суттєве значення для пригнічення транскрипції *in vitro*, яке спостерігається в експерименті.

Автори щиро вдячні професору Д. Н. Говоруну за плідне обговорення матеріалів дослідження.

L. H. Palchikovska, M. O. Platonov, I. V. Alexeeva, A. D. Shved

Mechanism of 6-azacytosine N1-glycosides interaction with catalytic site of phage T7 DNA-dependent RNA-polymerase: model quantum-chemical study

Summary

By the quantum-chemistry approach at the HF/6-31G (d, p) theory level for the first time considerable increase in the charge value of the atom N6 of azanucleosides in the model of catalytic site of phage

T7 DNA-dependent RNA-polymerase was recorded. The blocking of Mg^{2+} ion by the additional interaction with N6 atom in the azanucleoside-metal-Tyr639 complex seems to reduce the rate of elongation, that was confirmed experimentally by the significant decrease in the amount of synthesized RNA in a unit of time.

Key words: phage T7 DNA-dependent RNA polymerase, azanucleosides, 6-azacytosine N1-glycosides

Л. И. Пальчиковская, М. О. Платонов, И. В. Алексеева, А. Д. Швед

Механизм взаимодействия N1-гликозидов 6-азацитозина с каталитическим сайтом ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7: модельное квантово-химическое исследование

Резюме

Неэмпирическим методом квантовой химии на уровне теории HF/6-31G (d, p) впервые зафиксировано значительное увеличение величины заряда атома N6 азануклеозидов в модели каталитического сайта ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7. Блокирование иона Mg^{2+} дополнительным взаимодействием с атомом азота N6 в комплексе азануклеозид-металл-Tyr639 снижает скорость элонгации, что экспериментально подтверждено значительным снижением количества синтезированной РНК в единицу времени.

Ключевые слова: ДНК-зависимая РНК-полимераза фага Т7, азануклеозиды, N1-гликозиды 6-азацитозина.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пальчиковська Л. Г., Гарманчук Л. В., Алексеева І. В., Усенко Л. С., Шестакова Т. С., Соляник Г. І., Швед А. Д., Чехун В. Ф. N1-Глікозидні аналоги 6-азацитидину. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію // Біополімери і клітина.—2005.—21, № 5.—С. 433—439.
2. Alexeeva I. V., Dyachenko N. S., Nosach N. L., Zhovnovataya V. L., Rubalko S. L., Lozitskaya R. N., Fedchuk A. S., Lozitsky V. P., Gridina T. L., Shalamay A. S., Palchikovskaja L. G., Povnitsa O. Y. 6-Azacytidine — compound with wide spectrum of antiviral activity // Nucleosides, Nucleotides and Nucl. Acids.—2001.—20.—P. 1147—1152.
3. Платонов М. О., Говорун Д. М., Алексеева І. В., Судаков О. О., Бойко Ю. В., Пальчиковська Л. Г. Неемпіричний квантово-хімічний конформаційний аналіз 6-азацитидину — модифікованого нуклеозиду широкого спектру біологічної дії // Доповіді НАН України.—2004.—№ 3.—С. 163—169.
4. Temiakov D., Patlan V., Anikin M., McAllister W. T., Yokoyama S., Vassilyev D. G. Structural basis for substrate selection by T7 RNA polymerase // Cell.—2004.—116.—P. 381—391.
5. Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. J., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K. A., Su S., Windus T. L., Dupuis M., Montgomery J. A. Gamess (US) // J. Comput. Chem.—1993.—14.—P. 1347—1363.

УДК 573.3

Надійшла до редакції 29.09.05