

ХАРКІВСЬКОЇ ДЕРЖАВНОЇ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

АКСЬОНОВ СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ



МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ І КВАНТОВО-ХІМІЧНЕ
ВВІВЧЕННЯ НЕКАНОНИЧНИХ ПАР НУКЛЕОТИДНИХ
ОСНОВ

спеціальність 01.04.25 - біофізика

а в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків - 1998



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті прикладної фізики Національної академії наук України.

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук,
професор Суходуб Леонід Федорович

Офіційні опоненти: 1. доктор фізико-математичних наук,
Семьонов Михайло Олександрович
2. доктор фізико-математичних наук
Покровський Валерій Олександрович

Провідна організація: Фізико-технічний інститут низьких
температур Національної академії
наук України, м. Харків

Захист дисертації відбудеться "20" 06 1996 р.
о 15 годині на засіданні спеціалізованої Вченої Ради
Д 02.02.13 Харківського Державного університету, 310077,
м. Харків, пл. Свободи, 4, ауд. 7-4.

В дисертацію можна ознайомитись у Центральній науковій
бібліотеці Харківського державного університету.

Автор-реферат розісланий "20" 05 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої
Вченої Ради

Гаташ С.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми даної роботи зумовлюється тим, що особливості структури нуклеїнових кислот і досі валишаються до кінця невивченими. Запропонована в 1953 році Уотсоном і Кріком модель будови ДНК припускає тільки комплементарне в'єднання молекул азотистих основ, тобто аденіна (А) в тиміном (Т) або урацилом (U) і гуаніна (G) в цитозином (С), однак відомі випадки, коли правило комплементарного в'єднання не виконується. Це приводить до появи так званих "неканоничних" пар нуклеотидних основ (GT, AC, UU і т.і.). Увага науковців до молекулярної структури нуклеїнових кислот, до складу котрих входять неканоничні пари викликана такими причинами:

По-перше, утворення неканоничних пар нуклеотидних основ вважається можливою причиною виникнення точкових мутацій заміни - транзицій та трансверсій.

По-друге, неканоничні пари виникають під час взаємодії кодона і-РНК с антикодоном т-РНК в рибосомі, причому відсутність суворої відповідності не валамає вірному розпізнаванню.

По-третє, практичний інтерес до неканоничних пар нуклеотидних основ викликаний новою перспективою створення фармакологічних препаратів ДНК-сайтспрямованої дії, які призначені для блокування заадалегідь визначених ділянок генома, для чого пропонується використувувати дуплекси - нуклеотидні олігомери, комплементарні до ділянок ДНК. Однак накопичені експериментальні дані свідчать про небажано високу ймовірність утворення некомплементарних комплексів під час взаємодії таких дуплексів. Докладне вивчення причин, що приводять до утворення неканоничних пар надасть можливість запропонувати певні рекомендації по цілеспрямованому синтезу високоєфективних сайтспрямованих фармакологічних препаратів.

Об'єкт та предмет дослідження. Об'єктом дослідження є модельні системи на основі нуклеовидів і азотистих основ. Предметом дослідження виступає зв'язок між хімічною природою реагуючих молекул та інтенсивністю їх взаємодії.

Теоретична і методологічна основа дослідження. Одним з сучасних інструментальних методів, найбільш придатних до дослідження модельних систем на базі азотистих основ і нуклеовидів, є м'язюїонізаційна мас-спектрометрія (ММС). Перші емо-

периментальні роботи по впровадженню ММС як високоінформативно-го методу дослідження взаємодії азотистих основ були проведені в використанні польової іонізації. Цим методом досконально досліджена взаємодія нуклеотидних основ у вакуумі, але залишаються невивченими більш складні біоорганічні сполуки - нуклеовиди та нуклеотиди з-за їх недостатньої летючості та високої полярності. Ці сполуки можна досліджувати в використанні мас-спектрометрії в іонізацією бомбардуванням швидкими атомами (МС-БША) і плазмено-десорбційної мас-спектрометрії (ПДМС). Однією з тенденцій сучасних досліджень в галузі структурно-енергетичної молекулярної біофізики є поєднання експериментальних методів з теоретично-розрахунковими, що надає можливість зробити вибір між структурами комплексів що спостерігаються в експерименті.

Метою даної роботи було вивчення нековалентно зв'язаних каноничних і неканоничних комплексів нуклеотидних основ і нуклеовидів в умовах МС-БША, ПДМС та квантово-хімічні розрахунки можливих структур таких комплексів.

Досягнення цієї мети потребувало вирішення таких задач:

- винайти метод кількісної інтерпретації мас-спектрів БША;
- за допомогою м'якої іонізаційних мас-спектрометричних методів МС-БША і ПДМС дослідити утворення усіх можливих парних комплексів нуклеовидів та основ;
- побудувати ряди відносної стабільності пар нуклеовидів, зробити вибір найбільш стабільних асоціатів;
- за допомогою квантово-хімічного метода MNDO-H дослідити усі можливі конфігурації пар основ і нуклеовидів в різних таутомерних формах і зробити їх енергетичний аналіз;
- побудувати ряди відносної стабільності пар основ вгідно розрахункам і визначити роль енольних та імінних таутомерів у стабілізації асоціатів нуклеотидних основ.

Наукова новизна та практична цінність дисертації:

- Вперше в використанні МС-БША кількісно вивчені нековалентно зв'язані комплекси біоорганічних сполук. Це розширює коло експериментальних методів, які застосовуються для розв'язання аналогічних задач;

- Поряд з азотистими основами, методом МС-БША вперше кількісно вивчено комплексоутворення більш складних молекул - нуклеовидів. Здобуті результати можуть бути використані у

цілеспрямованих пошуках фармакологічних препаратів, що спрямовані на взаємодію з геномом клітин;

- Показано утворення у порівняно однаковій кількості неканоничних пар нуклеотидних основ і нуклеовидів разом із каноничними у конкретних умовах МС-БША і зроблений порівняльний аналіз усіх можливих пар нуклеовидів.

- Квантово-хімічним методом MNDO-H вивчена енергетика утворення і структура різноманітних неканоничних пар основ і нуклеовидів, у порівнянні з каноничними, а також ефектів протонування. Ці розрахункові результати, разом із експериментальними, дозволяють в новій точці зору розглянути механізми утворення неканоничних комплексів нуклеотидних основ;

- Запропонована нова модель механізму утворення комплексів під час процесу десорбції-іонізації МС-БША, що враховує наявність поверхнево-активних властивостей у досліджуємої речовини і показано її застосування у випадку нуклеовидів. Це є ще одним кроком до створення загальної теорії МС-БША.

На вахист виносяться такі положення:

- Використовуючи інтенсивності іонних струмів мас-спектрів БША можливо кількісно охарактеризувати димерні асоціати нуклеовидів;

- Мас-спектри БША і ПДМС вільних нуклеовидів и аотистих основ дозволяють зробити висновок про те, що молекули даних речовин вдатні утворювати неканоничні асоціати у кількості, що можливо порівняти із такою для каноничних;

- Із розрахунків методом MNDO-H впливу таутомерних переходів на стабілізацію водневих зв'язків випливає, що деякі основи у рідкісній таутомерній формі (зокрема G і T) вдатні утворювати більш міцну пару у порівнянні з тими ж основами у звичайній таутомерній формі;

- Запропонована фізико-хімічна модель утворення асоціатів речовин, що виявляють поверхневу активність, в умовах десорбції-іонізації МС-БША, дозволяє стверджувати, що ці асоціати утворюються насамперед на межі розділу полярної і неполярної фаз.

Головні результати роботи апробовані на:

Конференції "Применение масс-спектрометрии в биологии и медицине", ФТИНТ, Харків, 1992; I-ому з'їзді Українського біофізичного товариства, Київ, 1994; 13-ій Європейській конфе-

ренції по мас-спектрометрії, Будапешт, 1994; XII-ому Міжнародному семінарі по міжмолекулярній взаємодії і конформаціям молекул, Ін-т монокристалів, Харків, 1994; 3-ьому міжнародному симпозиумі по вастосуванню мас-спектрометрії в медицині і науках про життя, Сан-Франциско, 1994; Міжнародній науковій конференції "Фізика в Україні", Львів, 1995.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 3 статті.

Структура і об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, шести глав, заключення та висновків і переліку літератури в 158 пунктів.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ РОБОТИ

Перша глава містить огляд літератури, що присвячена дослідженням неканоничних пар як у модельних системах на базі дуплексів, так і в модельних системах на основі ізольованих основ і нуклеозидів, а також дослідженням фізико-хімічних властивостей основ і нуклеозидів. У комплексах дуплексів експериментально виявлені неканоничні пари основ, причому деякі пари майже не заважають міцному водневому зв'язку у комплексі і суттєво не порушують структуру подвійної спіралі. Відні основи у водному розчині не з'єднуються водневими зв'язками, але це відбувається у неполярних розчинниках, причому майже виключно комплементарно: А з Т, Г з С. Дані квантово-хімічних розрахунків комплексів основ загалом узгоджуються із експериментальними даними. Що стосується газового стану, основи і нуклеозиди з'єднуються в асоціати з різною відносною інтенсивністю в залежності від конкретних умов експерименту. При цьому в окремих випадках неканоничні асоціати утворюються у значній кількості.

У другій главі викладені основні характеристики експериментальних та розрахункових методів, які вастосовані в даній роботі, МС-БША, ІДМС та MNDO-H.

Третя глава містить відомості про конкретні методики, що були використані, а саме: про підготовку зразків для мас-спектрометричного аналізу, про обробку даних МС-БША, ІДМС, і методику розрахунку енергії водневих зв'язків методом MNDO-H.

За матриці для МС-БША використовували гліцерин та триетиленгліколь в добавку диметилсульфоксиду як сорочинників. При первісній обробці БША мас-спектрів інтенсивність кожного піка

домножували на фактор $(m/z)^{1/2}$ для корекції залежності коефіцієнта чутливості детектора від масового числа іона. Далі інтенсивність кожного піка нормували на суму інтенсивностей усіх піків в даному мас-спектрі. Статистичну обробку даних проводили для п'яти-восьми мас-спектрів. Відносні похибки нормованих іонних струмів лежали в межах 5-10% для малоінтенсивних піків і в межах до 2% для інтенсивних. Для мас-спектрів ПШМС проводили якісну обробку.

Розрахунки за методом MNDO-H проводили з повною оптимізацією геометрії за таким планом: вибирали пару нуклеозидів або нуклеотидних основ і розраховували структуру комплексу та енергію водневих зв'язків. За енергію водневих зв'язків приймали рівнище ентальпій утворення окремих молекул і цих самих молекул у комплексі між собою. Розрахунки повторювали, змінюючи стартові конфігурації комплексу та таутомерні форми молекул. Цей алгоритм повторювали для усіх можливих комбінацій нуклеозидів і основ.

Четверта глава присвячена концентраційним залежностям іонних струмів БША мас-спектрів та моделі утворення комплексних іонів в умовах БША мас-спектрометрії. Для вивчення гомокомплексних іонів були обрані як об'єкти дослідження гліцеринові ровчини аденовина (Ado), гуановина (Guo) та цитидина (Cyd), а вивчення концентраційної залежності гетерокомплексних іонів було проведене із сумісним ровчином Guo і уридина (Urd).

Було в'ясовано, що залежності як для гомо-, так і гетерокомплексних іонів не мають квадратичного характеру, що б мало бути, якби ці комплекси утворювались в об'ємі рідкої матриці або в газовому об'ємі. Ми припустили, що гліцерин, як ровчинник, перешкоджає утворенню комплексів нуклеозидів у своєму об'ємі, але комплекси можуть утворюватись на поверхні ровчину, на межі розділу полярної і неполярної (вакуум) фаз. Таким чином асоціація буде зумовлена не об'ємною, а поверхневою концентрацією нуклеозиду і ми можемо описати концентраційні залежності нормованого іонного струму I' димерного асоціата:

$$I'(2\text{H}) = A * C_M^2(\text{H}) / (B + C_M(\text{H}))^2 \quad (1)$$

де $C_M(\text{H})$ - масова концентрація нуклеозиду, $A = K_{\text{ІОН}}(2\text{H})K_p S_{\text{max}}^2$ і $B = MM(\text{H})K * 100\%/d$, $K_{\text{ІОН}}$ - константа іонізації, K_p - константа рівноваги в реакції асоціації, S_{max} - максимально можлива поверхнева концентрація нуклеозиду, K - така об'ємна концентрація

нуклеозида, при якій поверхнева концентрація дорівнює $S_{max}/2$, $M(Na)$ - молекулярна маса нуклеозида і d - густина розчину.

Щоб перевірити нашу модель, ми записали рівняння 1 у координатах $I^{-1} - C_M^{-1}(N_3)$ і застосували метод найменших квадратів для апроксимації експериментальних даних. Апроксимаційна крива вадовільно відстежує експериментальні точки.

Концентраційна залежність струму гетерокомплексних іонів G_{10} і Urd , як і гомокомплексних, також є не квадратичною, а близька до прямо пропорційної. Це дозволяє розширити на випадок гетероасоціатів припущення щодо переважності їх утворення саме на межі розділу полярної і неполярної фаз.

П'ята глава описує результати порівняльного експериментального мас-спектрометричного вивчення каноничних і неканоничних пар нуклеотидних основ та нуклеозидів.

Головним вихідним фактом експериментальної роботи є те, що іонні струми асоціатів нуклеозидів із еквімолярної суміші мають різні відносні інтенсивності в залежності від природи пари нуклеозидів, Рис.1. Такі співвідношення мали стабільний характер, відтворювались в експерименті. Напевно, що з мас-спектрів ВША можна вилучити інформацію про перевагу у комплексоутворенні нуклеозидів між собою.

Щоб кількісно охарактеризувати взаємодію нуклеозидів у реакції комплексоутворення по пікам мас-спектрів ВША, потрібно вибрати адекватний параметр. Як показало вивчення концентраційних залежностей іонних струмів, ми не можемо використовувати іонні струми замість концентрацій для розрахунку константи рівноваги K_p , оскільки вона буде різною для різних концентрацій, що суперечить її визначенню.

Враховуючи це, як характеристику переважності комплексоутворення ми обрали параметр K_E :

$$K_E = \frac{I'(N_1+N_2+H)}{((I'(A_0_1+H)+I'(N_1+H)) \cdot (I'(A_0_2+H)+I'(N_2+H)))^{1/2}} \cdot 100X$$

де A_0 - азотиста основа відповідного нуклеозида.

Результати розрахунків K_E за результатами вимірювань ВША мас-спектрів подані у Таблиці 1.

Таблиця 1. Параметр K_S асоціатів дезоксирибонуклеозидів, розрахований по іонним струмам БША мас-спектрів

асоціат	$K_S, \%$	асоціат	$K_S, \%$
2dAdo	$0,26 \pm 0,04$	dGuo*dCyd	$2,14 \pm 0,2$
dAdo*dGuo	$0,9 \pm 0,1$	dGuo*Thd	$0,38 \pm 0,04$
dAdo*dCyd	$1,19 \pm 0,1$	2dCyd	$2,02 \pm 0,3$
dAdo*Thd	$0,52 \pm 0,04$	dCyd*Thd	$0,77 \pm 0,07$
2dGuo	$1,15 \pm 0,1$	2Thd	$1,53 \pm 0,2$

З використанням мас-спектрометрії ПДМС нами була одержана інформація про взаємодію нуклеозидів, дезоксирибонуклеозидів, азотистих основ і деяких їх похідних (переважно метильних) між собою в кристалічному стані. Усі мас-спектри містять інтенсивні молекулярні піки, які в області мас 100-1000 атомних одиниць маси є домінуючими.

Іони асоціатів, незалежно від природи основи, мають стехіометрію загального вигляду $(M_n+H)^+$, де M - молекула основи або нуклеозида, n - ступінь кластеризації. Найбільший ступінь кластеризації демонструє Cyd та його нуклеозиди і похідні. На Рис.2 приведений ПДМС мас-спектр еквімолярної суміші Ado (MM=267) і Cyd (MM=243). Можна бачити, що мас-спектр містить піки, які відповідають їх неканонічному гетероасоціату (MM=510, m/z=511,2) і неканонічному гомоасоціату Cyd (MM=486, m/z=487,1). Мас-спектр суміші Guo і Cyd містить інтенсивний пік канонічного гетерокомплекса $(Guo+Cyd+H)^+$, а Ado і Urd - пік $(Ado+Urd+H)^+$. У мас-спектрах сумішей, що містять нуклеозиди і основи в усіх можливих комбінаціях по два та по три, найбільш інтенсивні піки серед неканонічних гетероасоціатів спостерігаються у такому складі: $(Ado+Guo+H)^+$, $(Ado+Cyd+H)^+$. Мас-спектр суміші Cyd і Urd містить піки трьох неканонічних асоціатів: $(2Urd+H)^+$, $(Urd+Cyd+H)^+$, $(2Cyd+H)^+$. Слід відмітити, що жодна суміш, що містила Guo та Thd, або їх основи, не демонструвала піків, які можна було б співвіднести до неканонічного асоціату цих нуклеозидів, або основ.

У жостій главі підсумовуються результати розрахунків структури та енергетики утворення комплексів нуклеозидів та

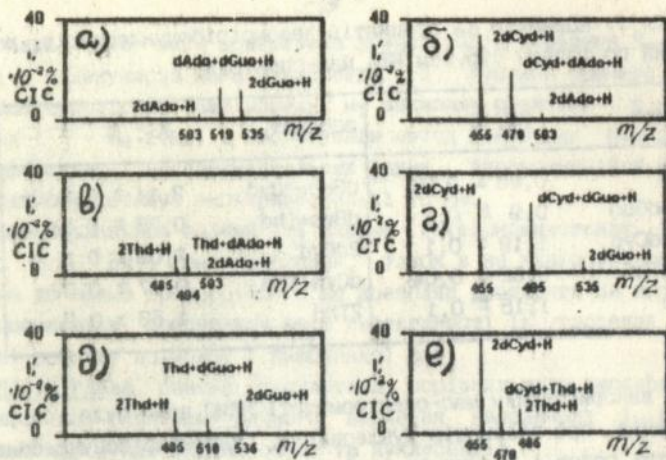


Рисунок 1. Ділянки мас-спектрів БША нуклеозидів, що відповідають діапазону масових чисел асоциатів. CIC - сумарний іонний струм. Суміші: а) dAdo, dGuo; б) dAdo, dCyd; в) dAdo, Thd; г) dGuo, dCyd; д) dGuo, Thd; е) dCyd, Thd.

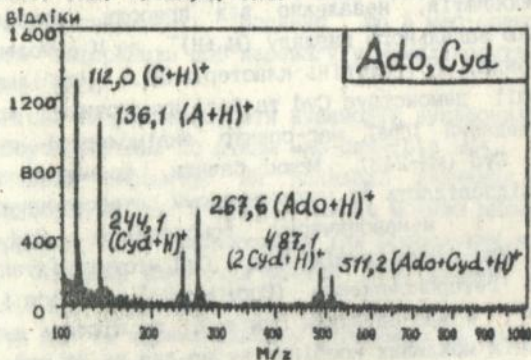


Рисунок 2. Мас-спектр ПДМС суміші Ado і Cyd. По вісі ординат - кількість іонів, при кількості зареєстрованих іонів в усьому мас-спектрі 12000.

нуклеотидних основ за квантово-хімічним напівемпіричним методом MNDO-H, а також проводиться порівняльне обговорення експериментальних та розрахункових результатів.

Результати квантово-хімічних розрахунків пар нуклеозидів та нуклеотидних основ у найбільш стабільних конфігураціях по-

дані у Таблиці 2.

Як відомо, енольні та імінні таутомери мають більшу енергію утворення, ніж кетонні та амінні. Тому утворення комплексів з основами в "незвичайних" формах має бути малоімовірним. Але з наших розрахунків можна зробити висновок, що якщо комп-

Таблиця 2. Енергії водневих зв'язків в асоціатах азотистих основ і нуклеозидів згідно квантово-хімічним розрахункам за методом MNDO-H. ->-> - взаємне розташування молекул пряме (сайти приєднання рибози спрямовані однаково), -><- - взаємне розташування молекул зворотне (сайти приєднання рибози спрямовані протилежно); - рідкісна таутомерна форма

асоціат	-ΔH, кДж/моль Н-зв'яз.	асоціат	-ΔH, кДж/моль Н-зв'яз
dAdo-dAdo	70,31 -><-, 2	G-C	119,63 ->->, 3
dAdo-dGuo	68,30 ->->, 2	G*-C*	144,21 ->->, 3
dAdo-dCyd	75,66 -><-, 2	G*-T	111,56 ->->, 3
dAdo-Thd	68,01 ->->, 2	G-T	64,50 ->->, 2
dGuo-dGuo	83,43 -><-, 2	G-T*	134,05 ->->, 3
dGuo*-dGuo	94,82 -><-, 3	C*-C*	101,87 ->->, 3
dGuo-dCyd	120,80 ->->, 3	C-T	60,44 ->->, 2
dGuo-Thd	68,34 -><-, 2	A(N3H ⁺)-G	77,33 ->->, 2
dGuo*-Thd	112,02 ->->, 3	A-G(N3H ⁺)	105,84 ->->, 2
dCyd-dCyd	86,78 -><-, 2	A-G(N7H ⁺)	90,20 ->->, 2
dCyd-dCyd*	96,43 -><-, 3	A(N1H ⁺)-C	171,13 ->->, 2
dCyd-Thd	60,51 ->->, 2	A(N3H ⁺)-T	88,62 ->->, 2
Thd-Thd	58,60 -><-, 2	A-T(O2H ⁺)	118,34 ->->, 2
A-A	69,68 -><-, 2	A(N3H ⁺)*-T*	158,00 ->->, 2
A-G	67,72 ->->, 2	A'-T(O2H ⁺)*	97,94 ->->, 2
A*-G	97,39 -><-, 2	G(N3H ⁺)-G	119,80 -><-, 2
A*-G*	83,60 -><-, 2	G(N3H ⁺)-G*	158,51 -><-, 3
A-C	75,53 -><-, 2	G(N3H ⁺)-C	210,51 ->->, 3
A-C*	81,59 ->->, 2	G(N3H ⁺)*-C*	182,04 ->->, 3
A-T	67,63 ->->, 2	G(N7H ⁺)-T	90,46 ->->, 2
A*-T*	104,58 ->->, 2	G(N3H ⁺)-T	100,91 ->->, 2
G-G	82,68 -><-, 2	G-T(O4H ⁺)	73,07 ->->, 2
G-G*	93,63 -><-, 3	C-C(N3H ⁺)	210,34 -><-, 3

лекс основ, зокрема G і T в "незвичайній" таутомерній формі, вже утворився, то він стає більш стабільним, ніж аналогічний комплекс з основами у "звичайній" формі. Такий комплекс з трьома водневими зв'язками наведено на Рис.3. Також стабільним, згідно розрахункам, є гомокомплекс C-C, з трьома водневими зв'язками, якщо одна з молекул C знаходиться в енольній, а інша в імінній формі.

Згідно експериментальним даним по переважності утворення асоціатів ми можемо розташувати пари нуклеозидів у ряд:
dGuo-dCyd > dCyd-dCyd >> Thd-Thd >> dAdo-dCyd > dGuo-dGuo >
dAdo-dGuo > dCyd-Thd > dAdo-Thd > dGuo-Thd > dAdo-dAdo

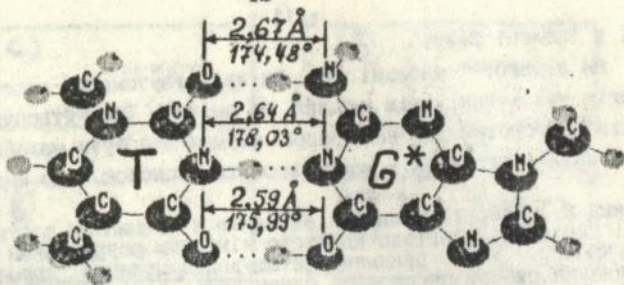
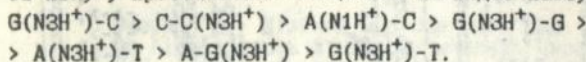


Рисунок 3. Оптимізована геометрія неканоничного асоціата T-G*, розрахована за методом MNDO-H. Гуанін в енольній формі. Енергія водневих зв'язків складає 111,56 кДж/моль.

Ряд, побудований згідно розрахованим енергіям водневого зв'язку у протонуваних асоціатах виглядає наступним чином:



Для цього ряду спостерігається задовільне узгодження з експериментом.

Сукупний аналіз мас-спектрів БША, ПДМС і розрахункових результатів пар нуклеозидів і азотистих основ дозволяє стверджувати, що найбільшу кількість димерів і з найбільшою енергією зв'язку утворюють Guo і Cyd, як і G і C, а найменшу кількість - Guo і Thd. Враховуючи те, що рідкісні таутомерні форми Guo Thd могли б утворювати стабільний асоціат, можна припустити, що такі форми не виникають у достатній кількості на межі розділу полярної і неполярної фаз.

ВИСНОВКИ

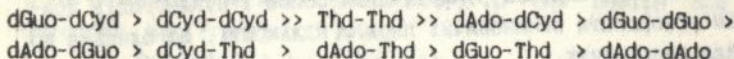
1. Показано, що в умовах десорбції-іонізації БША поряд з каноничними асоціатами азотистих основ і нуклеозидів утворюються і неканоничні димерні асоціати.

2. Показано, що можливий кількісний порівняльний аналіз ступеня взаємодії нуклеозидів між собою по інтенсивностям головних іонних струмів мас-спектрів БША. Для кількісного аналізу необхідно використовувати іонні струми, нормовані на суму головних струмів мас-спектра. Мірою переважності утворення го-мо- і гетероасоціатів в даному випадку є величина K_{G} :

$$I'(Na_1+Na_2+H)$$

$$K_g = \frac{I'(Na_1+Na_2+H)}{(I'(Ao_1+H)+I'(Na_1+H)) \cdot (I'(Ao_2+H)+I'(Na_2+H))} \cdot 100X^{1/2}$$

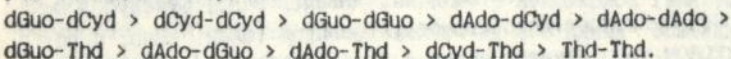
3. Побудований ряд переважності утворювання асоціатів нуклеозидів по даним МС-ЕША, який виглядає так:



Кількість деяких виникаючих неканоничних пар перевищує кількість каноничних, як це видно з мас-спектрів ЕША.

4. Квантово-хімічними розрахунками за полуміричним методом MNDO-H показано, що, неважаючи на більшу енергію утворення рідкісних (енольних чи імінних) таутомерів азотистих основ поза комплексом з аналогічними основами, деякі основи в рідкісній таутомерній формі, зокрема G і T, здатні утворювати більш міцну воднево-зв'язану пару, ніж ті ж самі основи у звичайній таутомерній формі.

5. Побудований ряд відносної стабільності нейтральних асоціатів основ і нуклеозидів у звичайних таутомерних формах по даним квантово-хімічних розрахунків за методом MNDO-H. Даний ряд виглядає наступним чином:



6. Побудований ряд відносної стабільності протонуваних асоціатів основ і нуклеозидів по даним квантово-хімічних розрахунків за методом MNDO-H. Даний ряд виглядає наступним чином: $G(N_3H^+)-C > C-C(N_3H^+) > A(N_1H^+)-C > G(N_3H^+)-G > A(N_3H^+)-T > A-G(N_3H^+) > G(N_3H^+)-T$, і він узгоджується в рядом переважності комплексоутворення за експериментальними даними.

7. Аналіз мас-спектрів ЕША азотистих основ і нуклеозидів (а саме: в мас-спектрах нуклеозидів не спостерігаються піки асоціатів азотистих основ, тоді як мас-спектр розчинів самих азотистих основ містять піки їх асоціатів) дозволяє зробити висновок про те, що асоціати, іони яких спостерігаються в мас-спектрах ЕША, десорбуються з матриці інтактно, не зазнаючи суттєвих рекомбінаційних процесів.

8. Запропонована модель утворення іонів асоціатів нуклеозидів, піки яких спостерігаються в мас-спектрах ЕША. Модель

спирається на той факт, що концентраційні залежності іонних струмів димерних асоціатів близькі до прямо пропорційних, і стверджує, що в утворенні гомо- і гетеродимерів беруть участь тільки ті молекули нуклеозидів, які знаходяться в поверхневому шарі рідкої матриці, на межі розділу полярної (розчинник) і неполярної (вакуум) фаз. Можливо зробити висновок, що саме таке місцезнаходження молекул нуклеотидних основ і нуклеозидів дозволяє їм утворювати неканоничні пари у кількості, що близька до такої для каноничних.

Головні результати дисертаційної роботи опубліковані у таких роботах:

1. Суходуб Л.Ф., Аксенов С.А. Наблюдение межмолекулярных комплексов дезоксирибонуклеозидов в масс-спектрах с бомбардировкой быстрыми атомами // Доклады АН Украины, 1993, н.2, с.96-98.

2. Суходуб Л.Ф., Аксенов С.А., Болдескул А.И. Масс-спектрометрическое и квантовохимическое исследование димерных ассоциатов нуклеозидов. // Биофизика, 1995, т.40, вып.3, с.506-512.

3. Aksyonov S.A., Sukhodub L.F. Concentration Dependence of Nucleoside Fast-atom Bombardment Mass Spectra. // Rapid Commun. Mass Spectrom., 1995, v.9, p.775-777.

4. Аксенов С.А., Веляева М.Ю., Чиванов В.Д., Суходуб Л.Ф. Наблюдение комплексов дезоксирибонуклеозидов (dAde, dGuo, dCyd, dThd) методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами // Тезиси конф. "Применение масс-спектрометрии в биологии и медицине", Харьков, 1992, с.68-69.

6. Аксьонов С.О., Суходуб Л.Ф. Порівняльне вивчення констант комплексоутворення між нуклеозидами методом мас-спектрометрії з бомбардуванням швидкими атомами // I з'їзд УБТ, Київ, 1994 (матеріали з'їзду), с.27-28.

7. Болдескул І.Е., Суходуб Л.Ф., Аксьонов С.О. Дослідження нуклеозидів та їх комплексів з водневими зв'язками квантово-хімічним методом MNDO-H // I з'їзд УБТ, Київ, 1994 (матеріали з'їзду), с.41-42.

8. Aksonov S.A., Boldeskul I.E., Sukhodub L.F. FAB mass spectrometry and MNDO-H quantum chemistry method study of the nucleoside complexes. // Proc. of 13-th Int. Mass Spectrom. Conf., Budapest, 1994, p.71.

9. Болдескул І.Е., Суходуб Л.Ф., Аксенов С.А. Изучение во-

дородно-связанных комплексов нуклеотидов квантово-химическим методом MNDO-H и масс-спектрометрией с ионизацией ЕВА. //Матер. XII Межд.семинара по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, Ин-т монокристаллов, Харьков, 1994.

10. Aksonov S.A., Sukhodub L.F. Investigation of the nucleosides complexation by FAB mass spectrometry. //Proc. of 3-rd Int.Symp. on Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences, San Francisco, 1994.

11. Boldeskul A.I., Aksonov S.A., Sukhodub L.F. Mass spectrometry and MNDO-H quantum chemistry method investigation of nucleoside and nucleobases complexes //Міжнар.наук.конф. "Фізика в Україні", Львів, 1995.

А Н Н О Т А Ц И Я

Аксёнов С.А. Масс-спектрометрическое и квантово-химическое изучение неканонических пар азотистых оснований. На правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.25 - биофизика. Харьковский государственный университет, г. Харьков, 1996.

В результате масс-спектрометрического анализа с методом ионизации бомбардировкой быстрыми атомами показано, что на поверхности раздела полярной (глицерин) и неполярной (вакуум) фаз образуются неканонические комплексы нуклеотидных оснований и нуклеотидов. Произведен количественный анализ масс-спектров и построены ряды относительной устойчивости комплексов всех возможных комбинаций нуклеотидов. Расчётами с использованием квантово-химического полуэмпирического метода MNDO-H показано, что некоторые пары оснований, в частности G-T, образуют более прочные водородные связи, если основания находятся в редких таутомерных формах. Предложена модель механизма образования комплексных ионов в условиях масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами.

SUMMARY

Aksyonov S.A. Mass spectrometry and quantum chemistry investigation of the noncomplementary nucleic acid base pairs. Thesis for a Candidate's degree of Physical and Mathematical Sciences on speciality 01.04.25 - biophysics. Kharkov State University, Kharkov, 1996.

Using fast atom bombardment mass spectrometry the appearance of the noncomplementary nucleic acid base and nucleoside complexes on the glycerol-vacuum phase boundary surface is shown. The quantitative mass spectra analysis was held and complex stability row is constructed for all possible nucleoside pairs. Using quantum chemistry MNDO-H method it is shown that some base pairs, especially G-T, form more stable hydrogen bonds in case of the rare tautomeric form of the bases as compared with usual tautomeric form. The mechanism of dimer ions formation in the fast atom bombardment mass spectrometry conditions is suggested.

К Л Ю Ч О В І С Л О В А

Нуклеовиди, нуклеотидні основи, неканоничні пари, мас-спектрометрія в іонізацію бомбардуванням швидкими атомами, плазмено-десорбційна мас-спектрометрія, квантово-хімічний метод MNDO-H.

Підп. до друку 28.04.1986.

Формат 60x84/16. Офс. пап. Офс. друк.

Умов. друк. арк. 0,8. Обл. ік.-вид. арк. 1,0.

Зам. 89.

Поліграфічно дільниця Інституту економіки НАН України,
252011, Київ-11, вул. Панаса Мирного, 26.

AM 21-12

AB 35.008