

УТИЦАЈ НАНОСОЛВАТАЦИЈЕ НА СТАБИЛНОСТ ПЕПТИДА ИЗОЛОВАНОГ У ГАСНОЈ ФАЗИ

А. Р. Милосављевић^{1)*}, М. Љ. Ранковић¹⁾, В. З. Церовски¹⁾, Ф. Канон²⁾, Л. Наон³⁾
и А. Ђулијани^{3),4),1}

1) Институт за физику, Универзитет у Београду, Прегревица 118, 11080 Београд

2) INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

3) Synchrotron SOLEIL, Saint Aubin, BP 48, 91192 Gif-sur-Yvette, France

4) UAR 1008 Cepia, INRA, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

**e-mail: vraz@ipb.ac.rs*

Апстракт. Утицај наносолватације на стабилност леуцин-енкефалин (Леу-Енк) пептида у гасном стању је студиран експериментално (повезивањем јонске замке и синхротронског зрачења) и теоријски (користећи молекуларну динамику и теорију густине функционала). Интензитет фотодисоцијације изолованог протонисаног Леу-Енк пептида, као и истог овог молекула хидратисаног са три молекула воде, је мерен у функцији енергије ВУВ фотонског млаза, у области 5-14 eV. Резултати показују значајно смањење интензитета фрагментације хидратисаног биополимера услед повећање везивне енергије система, што је потврђено и прорачунима.

1. УВОД

Структура и функционалност биомолекула су тесно повезане са воденим окружењем у коме се природно налазе. Због тога се константно раде истраживања у циљу разумевања утицаја молекула растварача у непосредном окружењу на тродимензионалну структуру биополимера (пептиди, протеини, ДНК) [1]. Сматра се да слабе молекуларне интеракције имају веома важну улогу при умотавању протеина и формирању макромолекуларних комплекса. У овом процесу солватација има кључну улогу.

Такође, бројне су студије процеса судара електрона, јона и фотона са изолованим молекулима који представљају градивне блокове или делове великог биолошког система, као што су ДНК и протеини. Последњих година, ове студије су пре свега мотивисане истраживањима радијационог оштећења биоматеријала, што може имати веома важне примене у биомедицини. Већина публикованих резултата се односи на релативно мале молекуле изоловане у гасној фази или депоноване на површинама, што омогућује студију са добро дефинисаним параметрима. Међутим, иако је овакав приступ веома користан за добијање почетних и конкретних резултата, молекули који се истражују не налазе се у условима који постоје у реалним биолошким системима. У циљу премощавања

¹ F. Canon²⁾, L. Nahon³⁾, A. Giuliani^{3),4)}

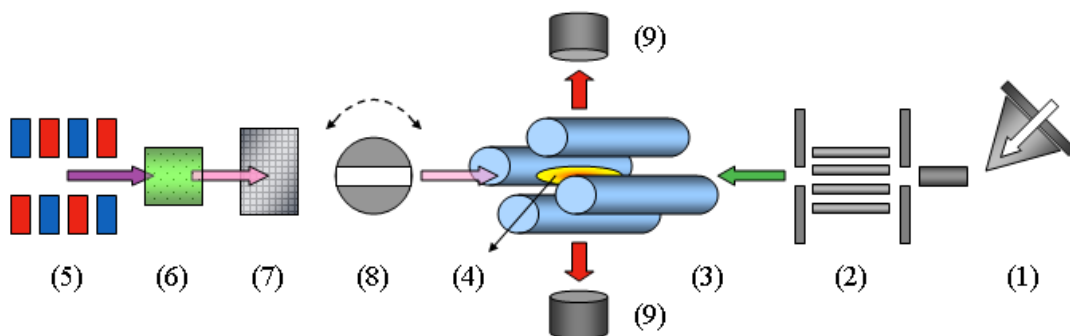
јаза између резултата добијених на изолованим биомолекула и њихове примене у реалним биолошким системима, рад са наносолватисаним системима, који такође могу бити изоловани и студирани под добро дефинисаним условима, је од великог значаја.

У овом раду је разматран утицај наносолватације на стабилност леуцин-енкефалин (Леу-Енк) пептида (“Try-Gly-Gly-Phe-Leu“) у гасном стању. Експериментални резултати су добијени повезивањем јонске замке и сунхротронског зрачења, чиме је омогућено мерење интензитета фотодисоцијације изолованог протонисаног Леу-Енк пептида, као и истог овог молекула хидратисаног са три молекула воде, у функцији енергије ВУВ фотонског млаза, у области 5-14 eV. Симулација структуре молекула је рађена користећи молекуларну динамику и теорију густине функционала.

2. МЕТОДЕ

Експеримент

Експериментални систем [2] се састоји од комерцијалног масеног спектрометра (“Thermo Finingan LTQ XL”) који је повезан са ВУВ синхротронским млазом фотона. Мерења су рађена на експерименталној станици “DESIRS” [3] синхротрона СОЛЕИЛ (Париз, Француска). Принципијелна шема експеримента је дата на слици 1. Јони испитиваног макромолекула (који садрже вишак или мањак протона) се добијају из раствора помоћу “electrospray” јонског извора (1), затим се системом сочива (2) уводе у јонску замку (3) са предње стране, где се селекује жељени прекурсор. Монохроматски млаз фотона се уводи у замку са задње стране, а специјални механички прекидач (“shutter”) (8) омогућује прецизно дефинисано време интеркације (око 500 ms) између фотона и селекуваних јона у замци. Након активације и фрагментације, снима се тандем масени спектар (MS^2) за дату енергију фотона.



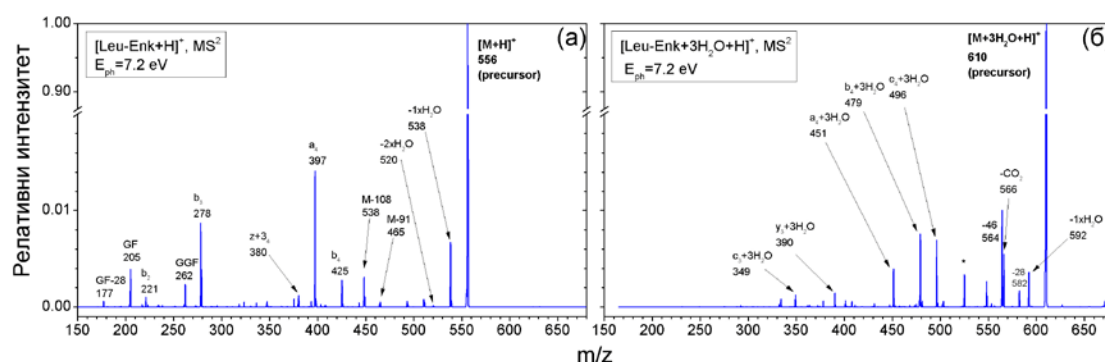
СЛИКА 1. Шема експеримента: (1) “electrospray” јонски извор; (2) јонска оптика; (3) линеарна квадруполна јонска замка; (4) заробљени јони; (5) “undulator”; (6) гасни филтар; (7) монохроматор; (8) ротирајући прекидач фотонског млаза; (9) детектори јона.

Теорија

Теоријско моделовање хидратисаног Леу-Енк је урађено коришћењем класичне молекуларне динамике за одређивање атомских конфигурација конформера које су затим оптимизоване помоћу теорије густине функционала (ТГФ) на нивоу B3LYP/6-31G(d). Избор теоријског нивоа ТГФ прати рад [4] где је одређено место протонације и два ниско-енергијска конформера Леу-Енк-а.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

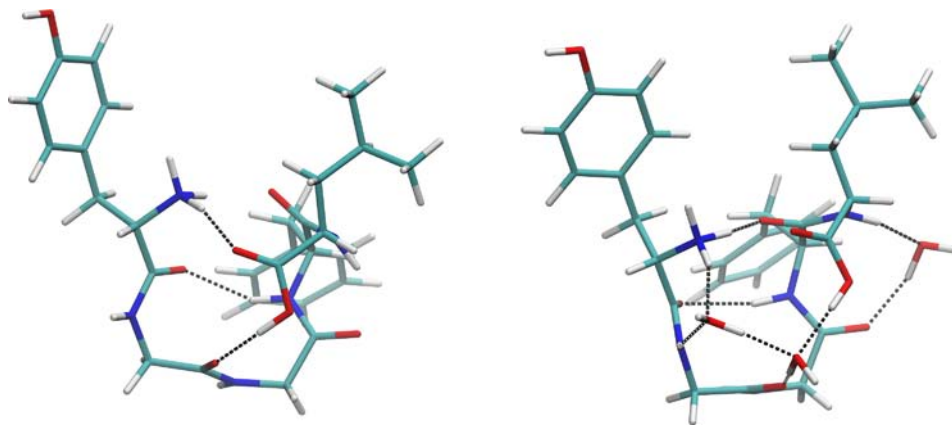
На слици 2 су приказани снимљени масени спектри након интеракције фотона енергије 7.2 eV са протонисаним Леу-Енк пептидом ($[\text{Leu-Enk}+\text{H}]^+$, слика 2а) и хидратисаним протонисаним Леу-Енк пептидом $[\text{Leu-Enk}+3\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, слика 2б). У случају чистог Леу-Енк молекула, могу се јасно уочити фрагменти који одговарају цепању пептидног ланца. Међутим, интензитет фрагментације је очигледно много мањи у случају хидратисаног прекурсора за исту енергију фотона. Ово указује на неку врсту заштитног ефекта, произведеног наносолватацијом пептида са свега три молекула воде. Такође је интересанто поменути да се у масеном спектру хидратисаног протонисаног прекурсора (слика 2б) појављују карактеристични пептидни фрагменти који су задржали три молекула воде.



СЛИКА 2. Тандем масени спектри Леу-Енк (а) и хидратисаног Леу-Енк (б) пептида, снимљени за енергију фотона од 7.2 eV.

Молекул воде се генерално лако везује водоничним везама и са другим молекулима воде као и са активним местима у полипептидним ланцима. Да би разумели како се вода везује са Леу-Енк на микроскопском нивоу, у овом раду смо тражили најстабилнији комплекс протонисаног Леу-Енк конформера најниже енергије и три молекула воде описаном методологијом. На слици 3 су приказане ТФГ оптимизоване структуре, где је у десном панелу приказана геометрија најниже нађене енергије хидратисаног комплекса. Добијена геометрија јасно показује да је енергијски најповољније везивање молекула воде са различитим активним местима пептида, док секундарна структура остаје врло

мало промењена. Укупан ефекат наносолватације према томе може да се разуме као додатна стабилизација секундарна структуре пептида преко ефективног повећања броја водоничних веза пептида остварених преко појединих молекула воде.



СЛИКА 3. ТФГ оптимизована геометрија ниско-енергијски конформера протонисаног Леу-Енк (леви панел) и хидратисаног Леу-Енк (десни панел) пептида. Испрекидане линије назначују водоничне везе.

ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад је спроведен уз подршку Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије, у оквиру пројекта 171020 и 171033, као и билатералног пројекта научне сарадње између Србије и Француске „Павле Савић“ (680-00-132/2012-09/06). Такође се захваљујемо: Agence Nationale de la Recherche Scientifique, France (n° ANR-08-BLAN-0065), COST Action MP1002 (Nano-IBCT), SOLEIL synchrotron radiation facility (beamtime under project 20110694).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] A. R. Milosavljević, V. Z. Cerovski, F. Canon, L. Nahon, A. Giuliani (submitted)
- [2] A. R. Milosavljević, C. Nicolas, J.-F. Gil, F. Canon, M. Réfrégiers, L. Nahon, A. Giuliani, *J. Synchrotron Radiat.* **19**, 174–178 (2012).
- [3] L. Nahon, N. de Oliveira, G. Garcia, J.-F. Gil, B. Pilette, O. Marcouille, B. Lagarde, F. Polack, *J. Synchrotron Radiat.* **19**, 508 (2012).
- [4] N. C. Polfer, J. Oomens, S. Suhai, B. Paizs, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5887–5897 (2007).