

9. *Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution* / A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak et al. // *Nature*.—1979.—282, N 5813.—P. 680—684.
10. *Стабников В. Н., Ройтер И. М., Процюк Т. Б.* Этиловый спирт.—М.: Пищ. пром-сть, 1976.—С. 106.
11. *Different conformations of double-stranded nucleic acids as revealed by circular dichroism* / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev // *Biopolymers*.—1973.—12, N 1.—P. 89—110.
12. *Веденов А., Дыхне А., Франк-Каменецкий М. Д.* Переход спираль — клубок в ДНК // *Успехи физ. наук*.—1971.—105, № 3.—С. 479—519.
13. *Peck L. J., Wang J. C.* Energetics of B-to-Z transition in DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1983.—80, N 10.—P. 6206—6210.
14. *Cooperative transitions in DNA with no separation of strands* / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat, A. K. Schyolkina // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*—1983.—47.—P. 243—250.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Кировскан. пед. ин-т

Получено 09.03.87

УДК 547.963.3

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА

ПОЛИ(dA) · ПОЛИ(dT) И А : Т-УЧАСТКОВ ДНК. РАСЧЕТЫ ЭНЕРГИИ НЕВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ, СОСТОЯЩЕЙ ИЗ РЕГУЛЯРНОГО ПОЛИНУКЛЕОТИДА И ДВУХ СЛОЕВ ВОДЫ В ЕГО ГЛИКОЗИДНОМ ЖЕЛОБЕ *

А. Г. Головинская, В. И. Полтев, В. П. Чуприна

Введение. Целый ряд экспериментальных данных [1—4] позволяет предположить, что участки двойной спирали ДНК, содержащие последовательности (dA)_n · (dT)_n, имеют специфическую конформацию, отличающуюся от В-формы ДНК со случайной последовательностью. В качестве структурной модели последовательности (dA)_n · (dT)_n часто рассматривают «гетерономную» ДНК Арнотта [1]. Предложенная на основании рентгеновских исследований волокон натриевой соли поли(dA) · поли(dT) эта модель имеет существенно разные конформации сахаро-фосфатных цепей, А-подобную конформацию цепи поли(dA) и В-подобную — поли(dT). Но данные ЯМР и Раман-спектроскопии [5, 6] не подтверждают существования такой конформации в растворе. Недавно [7] на основании рентгеновских исследований кальциевой соли поли(dA) · поли(dT) показана эквивалентность конформаций двух цепей, а на основании анализа данных Арнотта сделан вывод о близости конформации натриевой соли поли(dA) · поли(dT) к конформации кальциевой соли.

Характерной чертой двуспирального фрагмента d(CGCGAATTCGCG) в кристалле является наличие в его средней части водного «хребта», состоящего из двух слоев молекул воды [8]. Молекулы воды первого слоя соединяют Н-связями атомы N(3) аденина и O(2) тимина оснований соседних пар разных цепей. Молекулы воды второго слоя связаны Н-связями с атомами кислорода воды первого слоя. Этот хребет, по предположению Дикерсона и соавт. [8], играет важную роль в стабилизации В-формы и механизме В—А-перехода.

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

Принятые сокращения: поли(A : T) — регулярный двуспиральный полинуклеотид поли(dA) · поли(dT); поли(A : T : H₂O) — регулярная система, состоящая из поли(A : T) и двух слоев воды в гликозидном желобе, расположенных подобно «водному хребту» в кристалле d(CGCGAATTCGCG) [8]; А : Т-участки ДНК — участки ДНК, содержащие пары А : Т без шага TrA; L — ширина сахарного желоба двойной спирали, расстояние между ближайшими атомами фосфора противоположных цепей; R — расстояние между атомами N(3) аденина и атомом O(2) тимина соседней пары.

Ранее в работе [9] изучалась возможность формирования такого хребта на В-подобных конформациях ДНК с разпой последовательностью оснований. При этом влияние хребта моделировалось «подтягиванием» расстояний между N(3) и (или) O(2) и между атомами кислорода соседних молекул воды к значениям, характерным для кристаллов додекамера. Авторами был сделан вывод о возможности формирования протяженного водного хребта на А:Т-участках ДНК и изменении при этом конформации полинуклеотида. Вместе с тем в работе [9] не было представлено доказательств того, что в таких случаях хребет действительно будет формироваться и вызывать структурные перестройки. В данной статье мы приводим результаты расчетов энергии невалентных взаимодействий систем, состоящих из регулярного дуги спирального полинуклеотида поли(dA)·поли(dT) и двух слоев воды в гликозидном желобе. На основании расчетов предложена атомно-молекулярная структура последовательностей (dA)_n·(dT)_n.

Методика расчетов. Для поиска низкоэнергетических конформаций применены расчеты и минимизация энергии невалентных взаимодействий как функции выбранных независимых переменных по методике, примененной нами ранее для регулярного дуги спирального полинуклеотида [10, 11]. Параметры потенциальных функций для расчета внутримолекулярных взаимодействий взяты из работы [12], а взаимодействия вода — вода и вода — ДНК — из работы [13]. Конформация полинуклеотида определялась следующими независимыми переменными: 1) двумя параметрами спирали (расстояние между соседними парами вдоль спиральной оси, H , и угол поворота пары относительно соседней вокруг этой оси, τ); 2) пропеллером, TW (половина угла между основаниями в паре); 3) параметрами D и SL , определяющими смещение центра пары относительно оси спирали, и углами TL (тилт) и RL (ролл) наклона пары оснований к плоскости, перпендикулярной оси спирали; 4) гликозидными двугранными углами χ ; 5) параметрами, определяющими конформации сахарных колец двух цепей (по два валентных и два двугранных угла). Все эти параметры, кроме RL и SL , учитывались и в наших предыдущих работах [10, 11].

При рассмотрении поли(A:Т:Н₂O) учитывались еще 12 степеней свободы — по шесть для молекул первого и второго слоев воды. Положение молекул воды внутри каждого слоя предполагалось регулярным и определялось параметрами H и τ .

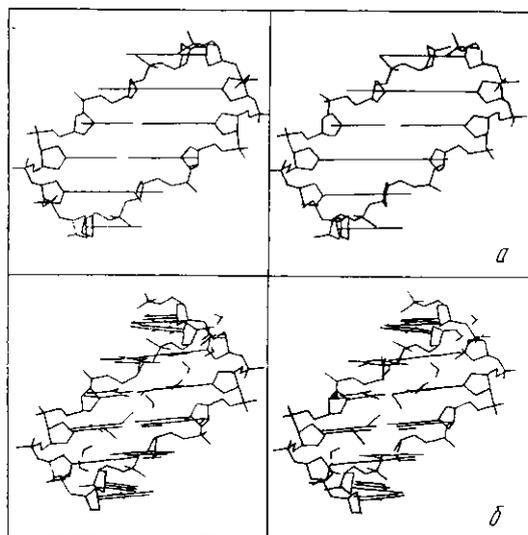
Фосфатные группы предполагались полностью нейтральными, если специально не оговорена степень их нейтрализации, которая моделировалась изменением зарядов на фосфатных кислородах, как в работе [14]. При расчетах с полностью нейтральными фосфатными группами взаимодействием несоседних нуклеотидов и взаимодействием между сахаро-фосфатными цепями пренебрегали. Если фосфатные группы не были полностью нейтрализованы, учитывалось их взаимодействие для шести соседних нуклеотидных пар. Атомы водорода СН₃-группы тимина ориентированы, как в работе [14]. Диэлектрическая постоянная принималась равной 4.

Суммарная энергия поли(A:Т:Н₂O) предполагалась состоящей из энергии внутримолекулярных взаимодействий полинуклеотида E_n , энергии взаимодействия полинуклеотида с водой E_{nw} , энергии взаимодействия между молекулами воды E_w . Значения энергии отнесены к одной нуклеотидной паре (учитывались взаимодействия молекул воды с шестью нуклеотидными парами).

Результаты и обсуждение. На рисунке представлены машинные изображения низкоэнергетических конформаций поли(A:Т) и поли(A:Т:Н₂O). В таблице приведены характеристики низкоэнергетических конформаций поли(A:Т) и поли(A:Т:Н₂O) при $H=0,323$ нм и $\tau=36^\circ$ (конформации 1 и 2 соответственно), низкоэнергетической конформации, полученной при минимизации по всем конформационным параметрам и заряде на фосфатной группе, равном $\sim 0,6$ заряда электрона (конформация 3), и для сравнения модели, построенной для кальциевой соли поли(dA)·поли(dT) в волокнах [7] (конформация 4).

Низкоэнергетические конформации при фиксированных значениях $H=0,323$ нм и $\tau=36^\circ$. Сравнение со структурой поли(dA)·поли(dT) в волокнах. Сравнение конформаций (см. таблицу) показывает, что взаимодействие с водным

хребтом на 0,04 нм уменьшает R ; на 0,14 нм уменьшает ширину гликозидного желоба L и делает отрицательным тилт. При этом рассчитанная низкоэнергетическая конформация поли(A:T:H₂O) становится похожей на конформацию поли(dA)·поли(dT) в волокнах практически по всем конформационным параметрам, в частности, по двугранным углам сахаро-фосфатного остова, фазовым углам псевдповращения сахаров, ширине гликозидного желоба. Конформация средней части декамера d(CGCGAATTCGCG), где расположен водный хребт, похожа на конформации 2 и 4. Кроме того, по-видимому, водный хребт



Стереонизображения низкоэнергетических конформаций поли(A:T) (а) и поли(A:T:H₂O) (б), полученные минимизацией по всем конформационным переменным. Вид со стороны гликозидного желоба. Видно уменьшение его ширины, увеличение τ , возникновение положительного пропеллера и отрицательного тилта при наличии водного хребта

Stereo view of low-energy conformations of poly(A:T) (a) and poly(A:T:H₂O) (b) obtained by all conformation variables minimization. View from the minor groove. Narrowing of the groove, an increase of τ , a positive propeller and a negative tilt can be observed with the presence of hydration spine

ответствен за тот факт, что из всех исследованных рентгеновским методом полинуклеотидов в волокнах [15] только те, на которых, согласно нашим представлениям, может формироваться водный хребт, существуют в виде В-конформации и не переходят в другие формы при изменении влажности и типа катионов. Это поли(dA)·поли(dT), поли(dI)·поли(dC) и поли(dA—dI)·поли(dT—dC).

Энергия внутримолекулярных взаимодействий в полинуклеотиде для конформации 2 выше, чем для конформации 1, всего на 1 ккал/моль, что связано в основном с ухудшением стэкинга оснований.

Низкоэнергетические конформации поли(A:T)

Характеристики найденных низкоэнергетических структур (конформации 1—3) и структуры поли(dA)·поли(dT) в волокнах [7] (конформация 4)

Parameters of the obtained low-energy structures (conformations 1—3) and of the poly(dA)·poly(dT) structure in fibers [7] (conformation 4)

Конформационный параметр	Номер конформации				Конформационный параметр	Номер конформации			
	1	2	3	4		1	2	3	4
α	-69	-61	-65	-50	H	0,323	0,323	0,334	0,323
β	178	181	180	188	τ	36	36	36	36
γ	61	54	58	41	D	0,11	0,1	0,1	0,08
δ	128	132	133	137	TW	7,5	7,5	6,1	10
ϵ	183	179	181	174	TL	-0,1	-5,3	-6	-6
ζ	-101	-103	-105	-102	L	0,108	0,94	0,95	0,923
χ	-120	-118	-120	-112	R	0,37	0,33	0,34	0,332
P	141	146	145	149					

Примечание. Значения двугранных углов и фазового угла псевдповращения сахаров (P) приведены усредненными по двум цепям (разница соответственных углов двух цепей не превышала 4°). Значения H , D , L и R указаны в нм.

: H_2O) при фиксированном $\tau = 36^\circ$. Для поли(A : T) при $\tau = 36^\circ$ имеется довольно протяженная область минимальных значений энергии, подобная найденной нами ранее для поли(dA) · поли(dU). Эта область включает конформации с большими значениями пропеллера и со значениями TW , близкими к 0° , с положительными и отрицательными значениями TL . Для поли(A : T : H_2O) эта область существенно уже, и наблюдается более резкая зависимость между TW и TL для низкоэнергетических конформаций. При этом существуют низкоэнергетические конформации как с небольшим ($TW \sim 3^\circ$, $TL \sim -12^\circ$, $H \sim 0,349$ нм, $D \sim 0,07$ нм, $L \sim 0,91$ нм), так и с большим пропеллером ($TW \sim 10^\circ$, $TL \sim -4^\circ$, $H \sim 0,326$ нм, $D \sim 0,1$ нм, $L \sim 0,94$ нм). Разница в энергии этих конформаций составляет несколько десятых ккал/моль. Оптимальная конформация поли(A : T : H_2O) близка к конформации 3 в таблице. При этом энергия внутримолекулярных взаимодействий полинуклеотида всего на несколько десятых ккал/моль выше, чем оптимальная энергия поли(A : T) при $\tau = 36^\circ$.

Низкоэнергетические конформации, полученные оптимизацией по всем конформационным параметрам. По результатам расчетов равновесный угол для поли(A : T) при условии полной нейтрализации фосфатов равен 36° [14]. При помещении отрицательных зарядов на фосфаты спираль раскручивается, при заряде $\sim 0,6 e$ угол τ становится равным $\sim 33^\circ$ (при этом $L \sim 0,12$ нм, $R \sim 0,4$ нм). Эти результаты расчетов подтверждают экспериментальные данные о том, что с возрастанием ионной силы увеличивается τ [16]. Наши расчеты поли(A : T : H_2O) показывают, что при заряде $\sim 0,6 e$ низкоэнергетическая структура характеризуется $\tau = 36^\circ$ (конформация 3 в таблице). Поскольку водный хребет в гликозидном желобе увеличивает τ , можно считать, что именно с его существованием в растворе поли(dA) · поли(dT) связан тот факт, что только этот полинуклеотид имеет $\tau = 36^\circ$ [2], а для других τ меньше.

В гликозидном желобе поли(dA—dT) · поли(dA—dT), по-видимому, нет водного хребта. Это следует из наших предварительных расчетов низкоэнергетических конформаций двуспиральных фрагментов АрТ и ТрА. Мы провели минимизацию энергии этих фрагментов из двух исходных конформаций, характерных для структуры поли(A : T : H_2O). Одна из них имела небольшой пропеллер ($TW \cong 3^\circ$, $TL \cong -12^\circ$, $L \cong 0,94$ нм), а другая — большой ($TW = 10^\circ$, $TL \cong -4^\circ$; $L \cong 0,95$ нм). Минимизация фрагмента ТрА из обеих этих конформаций (при фиксированном TW) приводит к понижению энергии на 4 ккал/моль и к положительным значениям TL . Энергетическая невыгодность существования конформаций этого фрагмента, характерных для поли(A : T : H_2O), связана в основном с ухудшением стэкинга оснований. А для фрагмента АрТ минимизация энергии приводит к понижению энергии всего на несколько десятых ккал/моль и небольшим изменениям конформационных параметров. Это позволяет сделать вывод, что водный хребет может формироваться только на А : Т-участках ДНК.

З а м е ч а н и я о п р а в и л а х К а л л а д и н а — Д и к е р с о н а. В соответствии с этими правилами [8, 17], вдоль цепи двуспиральной ДНК в зависимости от последовательности пуринов и пиримидинов закономерно изменяется ряд конформационных параметров, в том числе τ , TW , RL , SL . Эти изменения связаны с перекрыванием пуринов соседних нуклеотидных пар, принадлежащих разным цепям. Правила Калладина—Дикерсона выведены и апробированы на основании рентгеноструктурных данных для небольшого количества кристаллов двуспиральных олигонуклеотидов, в первую очередь нескольких модификаций додекамера d(CGCGAATTCGCG). Эти правила должны выполняться в соответствии с работами [8, 17] при больших положительных значениях пропеллера (что имеет место в кристалле додекамера), а причины больших значений пропеллера не вполне ясны. На наш взгляд, большой пропеллер в В-подобной структуре додекамера в значитель-

ной степени обусловлен существованием в средней его части водного хребта.

Конформации с узким гликозидным желобом, необходимым для формирования водного хребта, могут иметь, по нашим данным, как большой TW (тогда TL будет небольшим), так и небольшой ($\sim 3^\circ$), но при этом должен быть большим отрицательный тилт. Однако последняя конформация энергетически невыгодна для последовательностей пиримидин—пурип, для которых TL стремится к положительным значениям. Так что последовательности CpG, примыкающие к средней части додекамера, уменьшают из-за стэкинг-взаимодействий TL и в той его части, где существует водный хребет. А это приводит к большим значениям TW .

Для последовательностей, на которых не формируется водный хребет в гликозидном желобе, и в условиях, когда хребет разрушается (например при нагревании), зависимости параметров В-конформации от чередования пуринов и пиримидинов, выведенной Калладином и Дикерсоном, может не наблюдаться. При раскручивании спирали (уменьшение τ от 36° до $33\text{—}34^\circ$, характерных для ДНК в растворе [2]) происходит уширение гликозидного желоба, а TL и TW становятся близкими к 0° (это наглядно демонстрируют результаты наших расчетов на рисунке), что исключает перекрывание пуринов соседних пар, необходимое для выполнения правил Калладина—Дикерсона.

С этим согласуются данные о структуре двуспирального фрагмента $d(AAGTGTGACAT) \cdot d(ATGTCACACTT)$ в растворе, полученные с помощью ядерного эффекта Оверхаузера [18]. Проведенный нами анализ рентгеновских данных для волокон поли(dG—dC)·поли(dG—dC) [19] показал, что угол τ больше для шага CpG (около 42°), чем для шага GpC (около 30°), что противоречит правилам Калладина—Дикерсона.

Биологически важные следствия существования специфических конформаций, характерных для поли(A:T:H₂O). По данным Крозерса и соавт. [4], на стыке обычной В-конформации и специфической структуры, образованной повторяющимися парами A:T, происходят изгибы двойной спирали. По нашим данным, эта специфическая В-подобная конформация образуется в значительной степени под влиянием взаимодействий с водным хребтом. Наблюдаемое при нагревании уменьшение изгиба [4] связано с разрушением водного хребта.

По данным работы [3], на A:T-участках ДНК существенно замедляется разрыв сахаро-фосфатного остова под действием ДНКазы I. При повышении температуры эта аномалия исчезает. Авторы работы [3] связывают аномалию в поведении этих участков с узостью гликозидного желоба, который расширяется при нагревании. Наши результаты позволяют понять причины такого поведения: с участием водного хребта создается специфическая конформация, не соответствующая стереохимии ДНКазы I. При нагревании хребет разрушается, увеличивается ширина гликозидного желоба и уменьшается τ . Это уменьшение τ , по-видимому, можно зарегистрировать по изменению при повышении температуры электрофоретической подвижности кольцевых ДНК, богатых A:T-участками.

Таким образом, многие экспериментальные данные — от структурных данных по исследованию кристаллов и волокон двойных спиралей до результатов биохимического изучения влияния последовательностей оснований на ферментативные реакции — могут быть объяснены с помощью наших расчетов и вывода о формировании специфической конформации A:T-участков двойной спирали при взаимодействии с водным хребтом в гликозидном желобе.

STRUCTURE AND PROPERTIES OF poly(dA)·poly(dT) AND A:T SITES
IN DNA. CALCULATIONS OF THE ENERGY OF NONVALENT
INTERACTIONS IN THE SYSTEM CONSISTING OF A REGULAR
POLYNUCLEOTIDE AND TWO HYDRATION SHELLS IN ITS MINOR GROOVE

A. G. Golovinskaya, V. I. Poltev*, V. P. Chuprina

Research Computer Center, Academy of Sciences of USSR, Pushchino

* Institute of Biology Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

Summary

Interaction of poly(dA)·poly(dT) with two hydration shells forming a hydration spine similar to that found in the central part of the double-helical fragment d(CGCGAATTCGCG) in crystal to a considerable extent determines the existence of a specific polynucleotide conformation in fibers and in solutions. Atom-molecular models of these conformations with a narrow minor groove, a negative tilt and a positive propeller of the bases have been proposed. They explain a number of experimental facts concerning biologically important structural properties of DNA.

1. *Heteronomous DNA* / S. Arnott, R. Chandrasekharan, I. H. Hall, L. C. Puigjaner // Nucl. Acids Res.—1985.—11, N 2.—P. 4141—4156.
2. *Rhodes D., Klug A.* Sequence-dependent helical periodicity of DNA // Nature.—1981.—292, N 5821.—P. 378—380.
3. *Drew H. R., Travers A. A.* DNA structural variations in *E. coli tyrt* promoter // Cell.—1984.—37, N 2.—P. 491—502.
4. *Koo H.-S., Wu H.-M., Crothers D. M.* DNA bending at adenine thymine tracts // Nature.—1986.—320, N 6062.—P. 501—506.
5. *Sarma M. H., Gupta G., Sarma R. H.* Untenability of heteronomous DNA model for poly(dA)·poly(dT) in solution // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1985.—2, N 6.—P. 1057—1084.
6. *Wartell R. M., Harrell J. T.* Characteristics and variation of B-type DNA conformations in solution // Biochemistry.—1986.—25, N 9.—P. 2665—2671.
7. *Алексеев Д. Г., Липанов А. А., Скураговский И. Я.* Структура кальциевой соли poly(dA)·poly(dT) по данным рентгеновской дифракции в волокнах // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.—С. 189—195.
8. *Dickerson R. E., Kopka M. L., Pjura F.* Base sequence, helix geometry, hydration and helix stability in B-DNA // Biological macromolecules and assemblies / Eds F. A. Jurnak, A. McPherson.—New York: Wiley, 1985.—Vol. 2.—P. 37—126.
9. *Chuprina V. P.* Regularities in formation of the spine of hydration in the DNA minor groove and its influence on the DNA structure // FEBS Lett.—1985.—186, N 1.—P. 98—102.
10. *Chuprina V. P., Khutorsky V. E., Poltev V. I.* Theoretical refinement of A- and B-conformation models of regular polynucleotides // Stud. biophys.—1981.—85, N 2.—P. 81—88.
11. *Poltev V. I., Chuprina V. P.* Relation of macromolecular structure and dynamics of DNA to the mechanisms of fidelity and errors of nucleic acids biosynthesis // Structure and motion: membranes, nucleic acids and proteins / Eds E. Clementi et al.—New York: Adenine press, 1985.—P. 433—460.
12. *Журкин В. Б., Полтев В. И., Флорентьев В. А.* Атом-атомные потенциальные функции для конформационных расчетов нуклеиновых кислот // Молекуляр. биология.—1980.—14, № 5.—С. 1116—1130.
13. *Poltev V. I., Grokhlina T. I., Malenkov G. G.* Hydration of nucleic acid bases studied using atom-atom potential functions // J. Biol. Struct. and Dyn.—1984.—2, N 2.—P. 413—429.
14. *Torsional flexibility of B-DNA as revealed by conformational analysis* / V. B. Zhurkin, Yu. P. Lysov, V. A. Florentiev, V. I. Ivanov // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 5.—P. 1811—1830.
15. *Polymorphism of DNA double helices* / A. G. W. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekharan, R. L. Rattliff // J. Mol. Biol.—1980.—143, N 1.—P. 49—72.
16. *Hiuton D. M., Bode U. C.* Purification of closed circular deoxyribonucleic acid and its sedimentation properties as a function of sodium chloride concentration and ctidium binding // J. Biol. Chem.—1975.—250, N 3.—P. 1071—1079.
17. *Calladine C. R.* Mechanics of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA // J. Mol. Biol.—1982.—161, N 2.—P. 343—352.
18. *Clore G. M., Gronenborn A. M.* The solution structure of a B-DNA undecamer // EMBO J.—1985.—4, N 3.—P. 829—835.
19. *Wrinkled DNA* / S. Arnott, R. Chandrasekharan, L. C. Puigjaner et al. // Nucl. Acids Res.—1985.—11, N 5.—P. 1457—1473.

Н.-н. ВЦ АН СССР, Пущино
Ин-т биол. физики АН СССР, Пущино

Получено 15.12.86