

А. И. Егоренков

ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЛОКАЛЬНОГО РАСКРЫТИЯ ПАР АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ МОЛЕКУЛЫ ДНК

На основе атом-атомных потенциальных функций проведено численное моделирование динамики локального раскрытия пар азотистых оснований в модели триплексида В-формы молекулы ДНК. При помощи расчетов методом молекулярной динамики и изучения топологии поверхности потенциальной энергии, соответствующей анализируемому типу конформационной подвижности, исследована степень скоррелированности некоторых типов движений азотистых оснований раскрывающейся пары молекулы ДНК и показана зависимость путей раскрытия центральной пары от нуклеотидного состава фрагмента ДНК.

Введение. Физико-химические механизмы функционирования молекулы ДНК, как известно, связаны с динамикой ее двойной спирали. В процессах рекомбинации, репликации, транскрипции проявляются различные типы конформационной подвижности ДНК: от движения отдельных групп атомов до смещения больших участков молекулы [1, 2]. Разработана концепция изучения структурной динамики ДНК, которая позволяет описать конформационные возбуждения в ДНК [3]. В последнее время много внимания уделяется исследованию конформационной подвижности, связанной с локальным раскрытием пар азотистых оснований [4—9]. В связи с тем, что такая подвижность может играть значительную роль в процессах белок-нуклеинового узнавания [10], проблеме изучения этого типа подвижности, в том числе и теоретически-ми методами, остается актуальной.

Локальное раскрытие пар азотистых оснований представляет собой сложное движение, включающее большое число степеней свободы. Однако не все эти степени свободы одинаково важны для локального раскрытия, и в приближенной модели можно ограничиться доминирующими степенями свободы. В данной работе сделана попытка отбора наиболее существенных для раскрытия пар степеней свободы. Результаты такого отбора имеют значение для разработки теоретических моделей, позволяющих интерпретировать экспериментальные данные и адекватно описывать динамику раскрытия нуклеотидных пар.

Модель и методика расчетов. При выборе степеней свободы для азотистых оснований в настоящей работе использовали подход «жесткого сегмента» («segmented rigid body»). В данном подходе азотистые основания представляют жесткими сегментами с фиксированными валентными углами и длинами связей. Подобное представление оправданно, так как амплитуда и характерные времена колебаний атомов составляют десятые доли ангстрема и $t=10^{-12}$ с, что на несколько порядков меньше аналогичных характеристик движения азотистого основания как целого относительно двойной спирали ДНК. На порядок отличаются и энергии возбуждения малоамплитудных колебаний атомов азотистого основания ($E=0,6$ ккал/моль) и раскрытия отдельной пары ($E_{at}=5,6$ ккал/моль; $E_{gc}=19,2$ ккал/моль). Локальное раскрытие пары азотистых оснований сопровождается экспонированием донорно-акцепторных центров в большую или малую бороздки ДНК вследствие «разрыва» водородных связей между комплементарными основаниями пары.

Поэтому выбираются такие степени свободы азотистых оснований, которые могут осуществить «разрыв» водородных связей и экспонировать донорные и акцепторные группы в бороздки ДНК. Локальное раскрытие пары представляет собой движение с большой амплитудой, что позволяет связывать это движение с поворотами и сдвигами каждого из оснований пары относительно сахара-фосфатной цепи. Однако из-за внутримолекулярных взаимодействий раскрытие пары может быть стерически затруднено. Следовательно, необходимо учесть другие виды движений азотистых оснований в паре, которые бы ослабляли эти стерические ограничения. В работе [11] были выделены семь возможных типов движений для азотистых оснований: propeller twisting, base-pair rolling, glycosyl bond rotation, buckling, base-pair tilting, helical turning, base-pair sliding. Именно из них выбираются движения, способствующие «разрыву» водородных связей и не создающие сильных стерических ограничений: изменение угла «пропеллера» между плоскостями оснований (propeller twisting), поперечное смещение каждого основания пары вдоль оси «пропеллера» (sliding). Стерические ограничения, возникающие при локальном раскрытии пар азотистых оснований, связаны с взаимодействиями как внутри пары, так и между основаниями раскрывающейся пары и основаниями соседних пар, а также с сахаро-фосфатным остовом. Для изучения влияния на раскрытие пары оснований взаимодействия с соседними парами оснований и сахаро-фосфатным остовом в данной работе сравниваются случаи раскрытия свободной пары Ade·Thu, Gua·Cyt (без «внешнего поля») и случай раскрытия средней пары в тринуклеотидах В-формы ДНК (с учетом «внешнего поля»). При этом имеется возможность проследить вклад в топологию поверхности потенциальной энергии (ППЭ) системы каждой пары взаимодействующих атомов двух раскрывающихся оснований с учетом типа взаимодействия. В работе рассмотрены крайние случаи, когда раскрытие пары связано с наибольшими стерическими ограничениями. Такие стерические ограничения могут возникать при мгновенном возмущении азотистых оснований, когда сахаро-фосфатный остов и соседние пары не успевают сместиться со своих положений равновесия и остаются в невозмущенной В-форме ДНК. При этом не рассматриваются искажения валентных углов, неизбежно возникающие при таком возмущении. В анализируемой модели изучается движение азотистых оснований с «разорванной» в точке C1' атома гликозидной связью в поле фиксированного сахаро-фосфатного остова и соседних пар В-формы ДНК. Указанный случай дает возможность выявить те стерические ограничения, которые будут проявляться и в более сложных моделях раскрытия пар азотистых оснований. Рассмотрение этого случая оправдано возможностью локального раскрытия отдельной пары [12] и большей подвижностью сахаро-фосфатного остова по сравнению с подвижностью пары азотистых оснований в ДНК [8]. В более реалистических моделях благодаря подвижности сахаро-фосфатного остова и соседних пар будут вовлекаться те степени свободы, которые позволяют ослабить стерические факторы, затрудняющие движение оснований при жестком остове и неподвижных соседних парах. Это будет соответствовать медленному движению оснований, при котором более гибкий остов успевает принять оптимальную для данного положения азотистых оснований конформацию. Раскрытие пары оснований, вовлекающее в свое движение гибкий сахаро-фосфатный остов и соседние пары, происходит при медленном («адиабатическом») возмущении структуры ДНК белками или низкомолекулярными лигандами. Движение оснований при локальном раскрытии пары в случае мгновенного возмущения соответствует пико-секундному диапазону времени, а в случае «адиабатического» — наносекундному.

В обобщенной модели, предложенной в работе [3], конформационная подвижность молекулы ДНК разделена на три типа движений: качание азотистых оснований совместно с сахарами относительно цепей остова; движение азотистых оснований при изменении геометрии сахар-

ного кольца и угла гликозидной связи; движение азотистого основания в составе нуклеотида как целого. Указанные типы движений могут вызывать изменение геометрии (растяжение — сжатие) водородных связей между основаниями в паре. В этом случае также представляет интерес изучение раскрытия пар в рамках описанного в настоящей работе подхода.

Каждое азотистое основание раскрывающейся пары в данной модели имеет три степени свободы. Одна степень свободы соответствует повороту азотистого основания вокруг оси, проходящей через конец гликозидной связи (атом $C1'$ в случае равновесного Уотсон-Криковского положения оснований в паре) и перпендикулярной плоскости этого основания (углы $\varphi_{1,2}$). При локальном раскрытии меняется взаимное положение фуранозного кольца и азотистого основания вследствие псевдовращения кольца и вращения оснований вокруг гликозидной связи. Предлагаемый выбор осей позволяет учесть изменения энергии невалентных взаимодействий между атомами дезоксирибозы и азотистого основания и избежать стерических препятствий, вносимых соседними парами оснований. Вторая степень свободы азотистого основания соответствует повороту вокруг оси «пропеллера» пары оснований (углы $\varphi_{3,4}$). Эти углы задают направление осей вращения и определяют двугранный угол $P\tau$ между плоскостями оснований пары ($P\tau = \varphi_3 + \varphi_4$). Третья степень свободы азотистых оснований в раскрывающейся паре связана с раздвижением оснований вдоль оси «пропеллера» при $\varphi_1 = \varphi_2 = 0$ (sliding).

Потенциальная энергия вычисляется на основе атом-атомных потенциалов [13], включающих электростатическое (V^e), ван-дер-ваальсовое (V^{vdw}) взаимодействия и водородную связь (V^{hb}):

$$V = \sum_{i,j} (V_{ij}^e + V_{ij}^{vdw} + V_{ij}^{hb}); \quad V_{ij}^e = Q_i \cdot Q_j / \epsilon \cdot R_{ij};$$

$$\bar{V}_{ij}^{vdw} = -A_{ij}/R_{ij}^6 + B_{ij}/R_{ij}^{12};$$

$$V_{ij}^{hb} = (-D_{ij}/R_{ij}^{10} + C_{ij}/R_{ij}^{12}) \cdot \cos^2(\alpha_{ijk}),$$

где Q_i — заряд i -го атома; R_{ij} — расстояние между взаимодействующими атомами, α_{ijk} — внутренний угол треугольника, образованного донором протона (i), протоном (K) и акцептором протона (j) водородной связи с вершиной в точке i . Значения параметров Q_{ij} , A_{ij} , B_{ij} , C_{ij} , D_{ij} взяты из работы [14]. Множитель $\cos^2(\alpha_{ijk})$ в формуле введен для учета искажения водородных связей при отклонении азотистых оснований от положения Уотсон-Криковского равновесия [15]. Для вычислений R_{ij} , α_{ijk} использованы равновесные координаты атомов нуклеотидов из работы [16]. Отметим, что показанный в работах [17—19] неплюсский характер водородной связи между основаниями нуклеотидной пары может внести свой вклад в потенциальную энергию при раскрытии пары за счет образования водородных связей между основаниями ближайших вдоль цепи ДНК нуклеотидных пар. Так как образование подобных водородных связей возможно только при близких межатомных контактах, возникающих в основном между атомами оснований раскрывающейся нуклеотидной пары, то в данном приближении этот феномен можно не рассматривать. Растворитель учитывается неявно, за счет задания диэлектрической проницаемости $\epsilon = R_{ij}$.

Метод. Поставленную в данной работе задачу решали двумя методами: 1) построение сечений энергетической поверхности молекулы ДНК и 2) молекулярно-динамическое моделирование с использованием атом-атомных потенциальных функций. Известно, что поверхность потенциальной энергии молекулярной системы содержит в себе полные сведения о возможных конформациях этой системы. Топологические особенности энергетической поверхности определяют не только равновесные, но и неравновесные конформации, пути и особенности конформационных переходов. Одним из простых и наглядных способов изучения

сложных многомерных энергетических поверхностей является метод сечений и построения карт изолиний потенциальной поверхности системы. Ранее автором разработан пакет компьютерных программ, позволяющий автоматизировать процесс графического изучения поверхности потенциальной энергии [20]. Полученные при помощи этого пакета динамические «фильмы» изменения ППЭ, соответствующие локальному раскрытию оснований, могут быть представлены заинтересованным исследователям в виде записанной на дискете программы. Этот метод, дополненный данными моделирования с использованием молекулярной динамики, позволяет детально проанализировать влияние различных степеней свободы на динамику локального раскрытия пар.

Метод молекулярной динамики является одним из наиболее информативных способов численной имитации молекулярных движений на ЭВМ [21]. В результате молекулярно-динамического моделирования генерируется набор состояний изучаемой системы в последовательные моменты времени — динамическая траектория системы в ее фазовом пространстве. Различные характеристики системы получают как средние по времени вдоль траектории. Практически метод молекулярной динамики сводится к численному решению уравнений классической механики Ньютона для системы частиц с учетом взаимодействий между ними и заданными жесткими (химическими) связями. Для исследования характеристик применяют аппарат временных корреляционных функций. Поскольку $\Delta E/E \sim 10^{-3} < 1$ (ΔE — расстояние между вращательными уровнями энергии оснований; E — энергия уровня), изучение движения азотистых оснований проводили при помощи ньютоновых уравнений движения:

$$J_l \ddot{\varphi}_l'' = \sum_{i,j} \left[-\frac{\partial}{\partial R_{ij}} (V_{ij}^e + V_{ij}^{vdw} + V_{ij}^{hb}) \cdot (\vec{m}_{ij} \cdot \vec{n}_l) \right],$$

где индекс l обозначает ось вращения; φ_l'' — угловое ускорение относительно оси l ; J_l — соответствующий момент инерции; \vec{m}_{ij} — момент единичной силы взаимодействия i -го и j -го атомов; n_l — орт l -й оси вращения. Систему уравнений интегрировали численно на интервале до 2 пс. Динамические уравнения интегрировали при следующих начальных условиях: кинетическая энергия величиной 10 ккал/моль сообщалась по «твистовым» степеням свободы одному из оснований раскрывающейся пары. По полученным решениям определяли кинетические характеристики движения оснований. Кроме того, рассчитывали коэффициенты корреляции некоторых переменных:

$$C_{kl} = \left[\sum (\varphi_k(t) - \bar{\varphi}_k) \cdot (\varphi_l(t) - \bar{\varphi}_l) \right] / \left[\sum (\varphi_k(t) - \bar{\varphi}_k)^2 \cdot \sum (\varphi_l(t) - \bar{\varphi}_l)^2 \right]^{1/2},$$

где суммирование проводили по значениям углов $\bar{\varphi}_k$ и $\bar{\varphi}_l$ вдоль определенной траектории. Полученные значения коэффициентов были использованы для анализа взаимосвязи движений по различным степеням свободы. Подобный анализ может быть особенно полезным при увеличении числа степеней свободы системы.

Результаты и обсуждение. Для того чтобы проследить роль разных взаимодействий и выбрать существенные для раскрытия пары оснований степени свободы необходимо, во-первых, учесть вклад отдельных парных взаимодействий, во-вторых, исследовать разные случаи раскрытия (отдельная пара, пара в составе соседних пар и сахаро-фосфатного остова). При визуализации в виде динамических «фильмов» характерная ППЭ для парных взаимодействий получается, если в процессе раскрытия межатомное расстояние меняется в пределах $R_{ij} \leq R_0$ и $R_0 \leq R_{ij} < R_{\min}$, где R_0 — расстояние между атомами i, j , при котором $V_{ij} = 0$; R_{\min} — расстояние, соответствующее V_{\min} . В противном случае парное взаимодействие любых атомов не влияет на общую топологию ППЭ и сказывается только на значениях энергии. Поэтому при изучении вклада ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородной связи интерес

представляют только те атомы разных оснований, которые в процессе движения располагаются в указанных пределах. Это относится в первую очередь к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям и водородной связи как близкодействующим.

С учетом взаимодействий между всеми атомами оснований в паре были рассмотрены случаи, соответствующие движению азотистых оснований в свободной паре А·Т, G·C и движению оснований пары в силовом поле соседних пар и сахаро-фосфатного остова. Результаты исследований показывают, что при малоамплитудных колебаниях около положения равновесия характер движения оснований обусловлен в основном особенностями взаимодействия оснований внутри пары и очень слабо зависит от последовательности оснований. Типичной особенностью профиля энергетической поверхности, отвечающей области равновесной конфигурации пары, является ее анизотропия, которая и определяет движение оснований в парах А·Т, G·C в направлениях разных бороздок (движения в противофазе). Раскрытие пары является движением с большой амплитудой. В рамках полученных результатов можно сформулировать некоторые представления о процессе локального раскрытия, который может происходить в два этапа: 1) разрыв водородных связей между комплементарными основаниями и устранение сильных стерических ограничений, мешающих раскрытию; 2) движение азотистых оснований, приводящее к экспонированию донорских и акцепторных центров оснований в какую-либо из бороздок. Необходимый для раскрытия пары «разрыв» водородных связей осуществляется за счет локального раскручивания двойной спирали, определяемого и локальной подвижностью ДНК, и гибкостью молекулы как целого. Раскручивание двойной спирали может реализоваться по разным причинам: под действием флуктуационной подвижности, при изменении степени суперспирализации и т. д. После того, как водородные связи в паре разорваны и азотистые основания удалены друг от друга, дальнейший процесс (2-й его этап) будет происходить под действием силового поля, создаваемого соседними парами и сахаро-фосфатным остовом двойной спирали. Это силовое поле будет определяться типами соседних пар, т. е. зависеть от нуклеотидной последовательности. И так как при локальном расплетании колебательные вращательные степени свободы азотистых оснований раскрывающейся пары будут возбуждены, то азотистые основания приобретут некоторую энергию активации. В зависимости от степени возбуждения основания получают возможность преодолевать разной высоты энергетические барьеры, обусловленные взаимодействием с соседними парами и остовом, и подают в области конфигураций, соответствующих открытым состояниям. Можно предположить, что в каждой из бороздок ДНК возникнет строго индивидуальный порядок чередования донорных и акцепторных групп оснований раскрывшихся пар. Этот порядок будет зависеть от нуклеотидной последовательности данного участка ДНК и может влиять на белок-нуклеиновое взаимодействие. Таким образом, характер нуклеотидной последовательности задает возможную конфигурацию раскрывшихся пар. Данный вывод подтверждается результатами численного моделирования, приведенными в работе [6].

Методом молекулярной динамики показано, что «твистовые» движения комплементарных оснований происходят в противофазе. Включение «пропеллеровых» степеней свободы в стационарных внешних условиях почти не влияет на «твистовые» движения оснований в паре вплоть до «разрыва» водородных связей между ними. В случае учета степеней свободы в парах, соседних с раскрываемой парой (нестационарное «внешнее» поле), возмущение, сообщаемое одному из оснований средней пары, передается в основном на «пропеллеровые» степени свободы системы. Так что стэкинг-взаимодействие не передает раскрытие пары оснований по цепи.

Рассмотренная в работе простая модель позволила сделать лишь качественные выводы о характере раскрытия пары. Тем не менее, по-

лученные выводы вряд ли изменятся при анализе более реалистичных моделей, учитывающих гибкость сахаро-фосфатного остова. Можно предположить, что усложнение модели за счет учета большого числа нуклеотидов и коллективных степеней свободы не должно существенно изменить топологию ППЭ, рассмотренную в данной работе, поскольку эта топология определяется в основном стерическими ограничениями движения оснований в паре.

Автор благодарен Р. В. Полозову, Л. В. Якушевич (Институт биофизики, г. Пущино) за полезные замечания при обсуждении данной работы.

А. И. Егоренков

ЧИСЕЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ДИНАМІКИ ЛОКАЛЬНОГО РОЗКРИТТЯ ПАР АЗОТИСТИХ ОСНОВ МОЛЕКУЛ ДНК

Резюме

На основі атом-атомних потенціальних функцій здійснено чисельне моделювання динаміки локального розкриття пар азотистих основ у моделі тринуклеотида В-форми молекули ДНК. За допомогою розрахунків методом молекулярної динаміки та вивчення топології поверхні потенціальної енергії, що відповідає досліджуваному типові конформаційної рухливості, проаналізовано ступінь скорельованості деяких типів рухів азотистих основ пари, що розкривається, молекули ДНК і показано залежність шляхів розкриття центральної пари від нуклеотидного складу фрагмента ДНК.

А. И. Yegorenkov

NUMERICAL SIMULATION OF LOCAL BASE PAIRS OPENING IN DNA MOLECULE

Summary

The method of atom-atomic potentials has permitted to realize the numerical simulation of local base pairs opening in a trinucleotide model of B-form DNA molecule. Having used molecular dynamics calculation and also data concerning potential energy surface topology adequate to a type of conformation flexibility studied here, the author has determined correlation degree for some types of DNA bases movements in any opening DNA bases pair and has shown the dependence of opening processes in a central nucleotide pair on nucleotide content of DNA duplex being studied.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Якушевич Л. В. Динамика ДНК // Молекуляр. биология.— 1989.— 23, N 3.— С. 652—661.
2. Егоренков А. И. Пакет компьютерных программ для изучения биофизических основ молекулярной генетики // Биополимеры и клетка.— 1993.— 9, N 6.— С. 94—96.
3. Волков С. Н. Конформационные возбуждения в макромолекулах типа ДНК // Молекуляр. биология.— 1992.— 26, N 4.— С. 835—846.
4. Englander S. W., Kallenbach N. R., Heeger A. J., et al. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: Possibility of soliton excitations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1980.— 77, N 12.— P. 7222—7226.
5. Печеная В., Волков С. О механизме водородного обмена в ДНК // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, N 4.— С. 1134—1140.
6. Ramstein J., Lavery R. Base pair opening pathways in B-DNA // J. Biomol. Struct. and Dyn.— 1990.— 7, N 4.— P. 915—933.
7. Briki F., Ramstein J., Lavery R., Genest D. Evidence for the stochastic nature of base pair opening in DNA: A brownian dynamics simulation // J. Amer. Chem. Soc.— 1991.— 113, N 7.— P. 2490—2493.
8. Keepers J., Kollman P., Weiner P., James T. Molecular mechanical studies of DNA flexibility: Coupled backbone torsion angles and base-pair openings // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— 79.— P. 5537—5541.
9. Chen L., Feng Y., Prohofsky E. Premelting thermal fluctuational base pair opening probability of poly(dA)·poly(dT) as predicted by the modified self-consistent phonon theory // Biopolymers.— 1991.— 31, N 2.— P. 134—148.

10. *Von Hippel P., Berg O.* On the specificity of DNA-protein interactions // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 6.—P. 1608—1612.
11. *Holbrook S., Sung-Hou Kim.* Local mobility of nucleic acids as defumined from crystallographic data // J. Mol. Biol.—1984.—173.—P. 361—388.
12. *Франк-Каменецкий М. Д.* Флуктуационная подвижность ДНК // Молекуляр. биология.—1983.—17, N 3.—С. 639—652.
13. *Полозов Р. В.* Метод полумпирического силового поля в конформационном анализе биополимеров.—М.: Наука, 1981.—120 с.
14. *Weiner S., Kollman P., Case D. et al.* A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins // J. Amer. Chem. Soc.—1984.—106.—P. 765—784.
15. *Vedani A., Dunitz J.* Lone-pair directionality in hydrogen bond potential functions for molecular mechanics calculations: The inhibition of human carbonic anhydrase 2 by sulfonamides // Ibid.—1985.—107, N 25.—P. 7653—7658.
16. *Arnott S., Smith P. J., Chandrasekaran R.* // Handbook of biochem. and mol. biol. / Ed. G. D. Fasman.—New York: CRC press, 1976.—V. 2.—P. 411—422.
17. *Kotarov V. M., Polozov R. V., Konoplev G. G.* Non-planar structure of nitrons bases and non-coplanarity of Watson—Crick pairs // J. Theor. Biol.—1992.—155.—P. 281—294.
18. *Говорун Д. М., Мищук Я. Р., Кондратюк І. В., Желтовський М. В.* Про непланарність водневозв'язаних комплементарних пар основ ДНК // Тез. І Укр. симпоз. по водородній зв'язи.—Одесса, 1992.—С. 26.
19. *Мищук Я. Р.* Вивчення фізико-хімічної природи елементарних актів білково-нуклеїнового та нуклеїново-нуклеїнового впізнавання на низькомолекулярних модельних системах: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—К., 1993.—21 с.
20. *Егоренков А. И., Король В. В.* Пакет прикладных программ для графического изучения топологии поверхности потенциальной энергии, соответствующей конформационной динамике молекулы ДНК // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 5.—С. 66—72.
21. *Готлиб Ю. Я., Даринский А. А., Светлов Ю. Е.* Физическая кинетика макромолекул — Л.: Химия, 1986.—272 с.

Укр. мед. ун-т, Киев

Получено 23.11.93