

УДК 577.323+577.113

А.С. Рубан, Л.Н. Дымант, проф., д-р физ.-мат. наук

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: root@sevgtu.sebastopol.ua

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ 24-МЕРНОГО ФРАГМЕНТА ДНК – УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ С ФЕРМЕНТОМ ТОПОИЗОМЕРАЗА II: АНАЛИЗ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

Представлены результаты расчетов пространственной структуры дезоксирибонуклеотидного двухспирального дуплекса 5'-d(GGTCATGAATGACATGACGTAA), выполненных методами молекулярной механики. Проведен анализ конформационных параметров исследуемого дуплекса. Из всех полученных расчетных структур для исследуемой 24-мерной нуклеотидной последовательности, построенных при явном моделировании водно-ионного окружения, выявлены структуры, параметры которых наиболее отвечают регулярной дуплексной форме олигомера. Конформационные характеристики рассчитанных структур находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными, полученными на основании рентгеноструктурного анализа и ЯМР-эксперимента.

ВВЕДЕНИЕ

Двойная спираль ДНК содержит информацию двух типов, которые кодируются и считываются по-разному. Собственно генетическая информация, то есть информация, определяющая структуру белков, записана привычным триплетным кодом, расшифровка которого происходит вне ДНК. Другой тип информации заложен в пространственной организации молекул. Специфическая геометрия фрагментов ДНК важна, например, в процессах белково-нуклеинового узнавания и при взаимодействии ДНК с различными биологически активными соединениями. В частности, локальные флуктуации в структуре спирали могут влиять на узнавание определенных нуклеотидных последовательностей различными ферментами, связывающимися с ДНК. Структура ДНК в участке связывания должна соответствовать специфической конформации белка. Следовательно, информация, определяющая генетическую регуляцию, трехмерна, ее расшифровка происходит непосредственно на ДНК и зависит от структурных свойств белка и двойной спирали.

В последние годы достигнут существенный прогресс в определении детальной структуры нуклеиновых кислот. Проведены высокоразрешающие рентгеноструктурные исследования монокристаллов синтетических олигонуклеотидов образующих короткие спирали (дуплексы). Развитие экспериментальных методик ЯМР и, в особой мере, двумерной ЯМР-спектроскопии дало принципиальную возможность изучения конформаций коротких последовательностей нуклеотидов на атомном уровне непосредственно в растворе.

На сегодняшний день молекулярное моделирование и использование современных силовых полей позволяет детально изучать пространственную организацию биомолекул и их динамику. Применение экспериментальных данных (в частности, ЯМР-спектроскопии) может существенно увеличить точность моделирования при расчетах пространственных структур молекул. Ранее [1] методами молекулярной механики были произведены расчеты пространственной структуры дуплекса октамера 5'-d(GACATGTC) при использовании различных параметрических систем и данных двумерного ЯМР-эксперимента (2D-NOESY). Исследования показали, что при надлежащем выборе методики расчетов можно получить хорошее соответствие между расчетными и экспериментальными данными. Вместе с тем, опробованные с использованием данных эксперимента методики расчетов позволяют получать достаточно достоверные результаты в соответствующих молекулярных системах и в том случае, когда такие данные отсутствуют.

В настоящей работе методами молекулярной механики исследовалась пространственная структура 24-мерного фрагмента ДНК 5'-d(GGTCATGAATGACATGACGTAA). Исследуемый 24-мерный олигонуклеотид является участком полимерной молекулы ДНК, с которым связывается в процессе своего функционирования Топоизомераза II человека. Известно, что фермент Топоизомераза II решает топологические проблемы, которые появляются при считывании информации на ДНК. В связи с этим изучение структурных особенностей данных участков ДНК представляет существенный научный интерес.

Расчеты выполнялись методами молекулярной механики без введения каких-либо дополнительных ограничений на основе экспериментальных данных.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Расчеты пространственной структуры и динамики теплового движения атомов 24-мерного дуплекса дезоксирибонуклеотида выполнены с помощью программ XPLOR [2] и NAMD [3]. Для описания атомных взаимодействий использована параметрическая система CHARMM27 [4], ориентированная на изучение нуклеиновых кислот. Стартовые конфигурации генерировались с помощью программы HyperChem 7.0 и соответствовали классической В-форме ДНК. Каждая олигонуклеотидная цепь терминировалась с 5'- и 3'-концов ОН-группой.

Расчеты выполнялись с учетом водно-ионного окружения молекулы, которое моделировалось явно или же с использованием приближения сплошной среды, характеризуемой как постоянной, так и зависящей от расстояния диэлектрической проницаемостью $\epsilon=2.5$. С целью оптимизации вычислений в ряде случаев использовались методики, позволяющие фиксировать координаты молекул воды, отстоящих от тяжелых атомов

дуплекса на расстояниях больших, чем $4\text{\AA}$, а также процедура SHAKE для ограничения длины валентных связей в молекулах воды. При явном моделировании водно-ионного окружения система содержала $N=5248$ молекул воды, размещенных в прямоугольном боксе размером $95 \times 36 \times 46\text{ \AA}$. Топология и параметризация молекул воды соответствовали модели TIP3P [5]. Нейтрализация избыточных электрических зарядов фосфатов в дуплексах олигомеров обеспечивалась 46 ионами Na^+ , находящимися вблизи атомов фосфора на расстояниях $4,5\text{--}6\text{ \AA}$ вдоль биссектрис углов O-P-O. Для моделирования ионной силы раствора $\sim 0,1$ моль Na^+ в исследуемую молекулярную систему дополнительно вводились ионы натрия и хлора, замещающие некоторые из молекул воды.

Оптимизация геометрии исследуемых дуплексов дезоксиолигонуклеотидов осуществлялась путем минимизации потенциальной энергии молекул а также с использованием процедур “отжига” от высокой ($500\text{--}600\text{ K}$) до комнатной температуры. В процессе отжига на каждом шаге цикла, обеспечивавшем снижение температуры на 10° , проводились расчеты молекулярной динамики по алгоритму Verlet с временным шагом 1 фс в течение $2\text{--}15\text{ пс}$. Электростатические взаимодействия и взаимодействия Ван-дер-Ваальса ограничивались радиусом $r_{\text{off}} = 10,5\text{ \AA}$ с использованием дополнительной энергетической функции SHIFT, включающейся при $r_{\text{on}} = 9,5\text{ \AA}$.

Визуализация расчетных структур дуплекса дезоксиолигонуклеотида и теплового движения атомов в исследуемой молекулярной системе выполнялась с помощью программы VMD [6]. Конформационные параметры расчетных структур определялись на основе программы FREEHELIX [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного вычислительного эксперимента был получен ряд низкоэнергетических структур дуплекса 24-мерной последовательности 5'-d(GGTCA TGAATGACTA-TGCACGTAA) с различными конформационными параметрами. При этом ни одна из структур олигомера моделированного в вакууме не отвечала характеристикам регулярной дуплексной формы ДНК. При моделировании в приближении сплошной среды с постоянной по величине, а также зависящей от расстояния диэлектрической проницаемостью среды ϵ выявлены структуры (сМ, гМ), параметры которых в достаточной мере соответствуют имеющимся в литературе данным по конформационным состояниям ДНК в условиях эксперимента.

Из всех полученных расчетных структур 24-мерного дуплекса дезоксиолигонуклеотида построенных при явном моделировании водно-ионного окружения было выбрано три, представленных здесь как А, В, С, параметры которых наиболее отвечают регулярной дуплексной форме олигомера. Необходимо отметить, что фиксация координат молекул воды, отстоящих от тяжелых атомов олигомера более, чем на $4\text{ \AA}$, при прочих равных условиях оказывает существенное влияние на конформацию дуплекса октамера. Выбранные структуры были получены, как правило, при использовании указанного ограничения на движение молекул воды (процедура fix [2]), хотя ранее при расчете октамера [1] наиболее соответствующая эксперименту геометрия молекулы получалась без использования такого ограничения.

На рисунке 1 представлена расчетная структура В дуплекса 24-мерной дезокси-олигонуклеотидной последовательности d(GGTCA TGAATGACTA TGCACGTAA), построенного при явном моделировании водно-солевой среды. Для удобства визуализации фрагмент ДНК представлен без водно-ионного окружения

В таблице 1 приведены для ряда расчетных структур 24-мера значения среднеквадратического отклонения (СКО) координат атомов в дуплексе и в его шести центральных звеньях от координат соответствующих атомов в классической В-форме ДНК. Величина СКО в выбранных расчетных структурах достигает $2\text{ \AA}$, причем для дуплекса, моделируемого при фиксации координат дальних молекул воды, этот параметр значительно ниже, чем без фиксации последних.

Следует отметить, что величина СКО между координатами атомов в структуре В и в дуплексе с параметрами классической В-формы ДНК составляет $0,6\text{ \AA}$ для всей нуклеотидной цепи и $0,55\text{ \AA}$ по шести центральным нуклеотидным звеньям. В структурах, полученных без моделирования водно-ионной среды, эти значения существенно выше. Вариации координат атомов центральных звеньев в различных расчетных структурах невелики ($\sim 1\text{ \AA}$), в то время как изменения позиций атомов в целом по олигомеру довольно значительны, по-видимому, за счет движения терминальных звеньев.

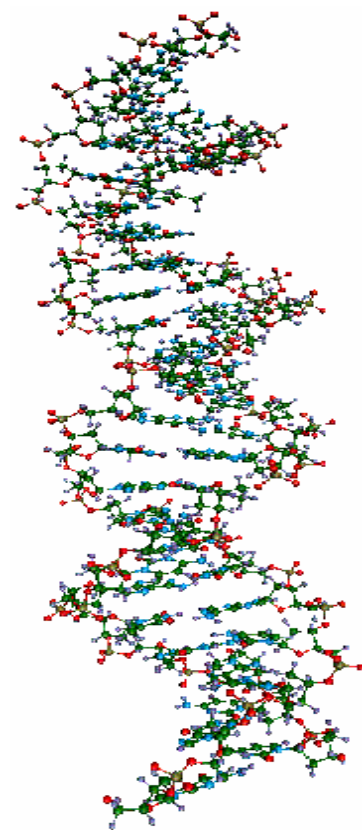


Рисунок 1 – Расчетная структура дуплекса 24-мерной дезоксиолигонуклеотидной последовательности d(GGTCA TGAATGACTA TGCACGTAA), построенной при явном моделировании водно-солевой среды

Анализ энергии атомных взаимодействий в расчетных структурах показал, что наиболее оптимальной из них является расчетная структура В. Общая потенциальная энергия всей моделируемой системы для этой структуры составляет $E_{total} = -1918$ ккал/моль. Энергетические вклады от ван-дер-ваальсовых, электростатических и валентных взаимодействий (последнее учитывает деформацию валентных связей, валентных и пространственных углов) между атомами 24-мера, ионами Na и Cl без учета взаимодействий с водой составляют $E_{VDW} = 8,9$ ккал/моль, $E_{elec} = -3744$ ккал/моль, $E_{val} = 1817$ ккал/моль, соответственно. Во всех трех расчетных низкоэнергетических структурах наблюдается существенная гетерогенность в конформации на различных участках двухспирального дуплекса. Существенные вариации имеет угол спирального вращения Ω . В структуре В, в частности, угол спирального вращения Ω изменяется от $21,0^\circ$ до $44,3^\circ$ (рисунок 2) при его среднем значении $34,5^\circ$. Аналогичные изменения угла Ω наблюдаются во всех расчетных структурах, при этом для дуплекса в конформациях А и С средние значения составляют $\Omega_{cp} = 34,5^\circ$ и $\Omega_{cp} = 34,6^\circ$ соответственно.

Таблица 1 – Значения СКО координат атомов расчетных дуплексов и В-формы ДНК

По шести внутренним звеньям 24-мера		
$\varepsilon = 2,5$	eM	1,72
$\varepsilon \sim \tau$	rM	0,82
	B	0,55
	A	0,87

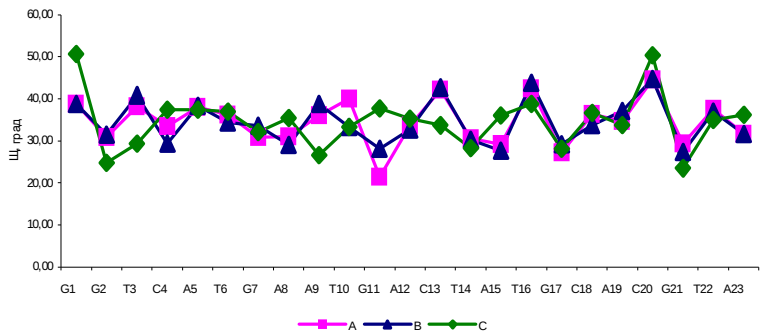


Рисунок 2 – Локальные значения угла спирального вращения Ω

	C	1,99
По всему дуплексу		
$\varepsilon = 2,5$	eM	2,54
$\varepsilon \sim \tau$	rM	0,84
Водно-ионная среда	B	0,60
	A	0,64
	C	1,48

Другой существенный конформационный параметр – угол пропеллера ω в рассматриваемых структурах для большинства участков имеет отрицательное значение, характерное для В-формы ДНК (рисунок 3). В то же время разброс значений весьма большой, особенно в структуре С. В двух терминальных звеньях 24-мерных фрагментов со стороны 5'-конца наблюдаются достаточно высокие положительные значения угла пропеллера. Отметим, что на этих же участках имеет место значительное закручивание пар оснований, при этом угол спирального вращения Ω достигает 50° (рисунок 2). Среднее значение угла пропеллера ω_{cp} по расчетным структурам А, В и С равно - $8,1^\circ$, $-7,5^\circ$ и $-12,1^\circ$ соответственно. Следует отметить, что в дуплексах, рассчитанных с тем же силовым полем CHARMM27 без водно-ионного окружения, угол ω принимает положительные значения даже на некоторых центральных участках.

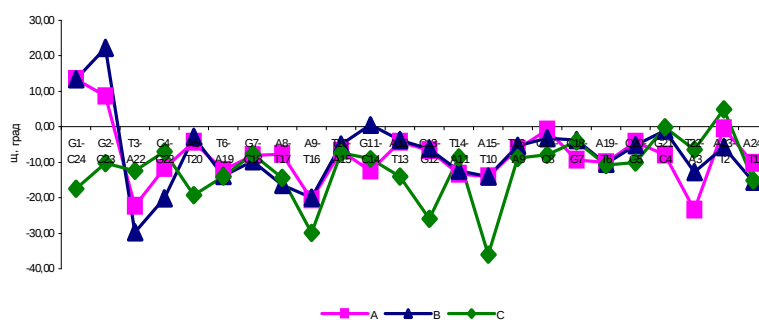


Рисунок 3 – Локальные значения угла пропеллера ω

Угол раскрытия пар ρ , сохраняя, как правило, положительные значения, испытывает резкие изменения на участках C13-A15 и A19-T22, достигая отрицательных значений -10° (рисунок 4). Такой характер изменения ρ соответствует правилу Калладина [8]. В частности, для структуры В данное правило выполняется в полной мере, угол ρ для пиримидин-пуриновой последовательностей оснований на участках (C4-A5), (T6-G7), (T10-G11), (T14-A15), (T16-G17) и (C18-A19) принимает большие положительные значения, т.е. пары сильно раскрываются в сторону малой канавки, а в случае пурип-пиримидиновых (A5-T6), (A9-T10), (G17-T18) и (A19-T20) последовательностей этот угол существенно уменьшается или принимает отрицательные значения (рисунок 4). Этому же правилу отвечают вариации параметра линейного смещения пар оснований вдоль продольной оси D_y . Смещение D_y уменьшает невыгодные контакты пуринов противоположных цепей на пиримидин-пуриновых участках цепи (C4-A5), (T6-G7), (T10-G11), (T14-A15), (T16-G17), (C18-A19) и (C20-G22). Для параметра D_y правило Калладина выполняется даже на терминальных участках. В то же время угол спирального вращения Ω не отвечает в полной мере данному правилу у всех рассматриваемых структур

В процессе исследования, как при оптимизации молекулы по потенциальной энергии, так и при процедуре отжига, не выявлено каких-либо разрывов водородных связей между комплементарными парами оснований. Расстояния между донорами и акцепторами не превышает 2,95 Å. Ширина большой канавки двойной спирали, усредненная по кратчайшим расстояниям между атомами фосфора звеньев двух противоположных цепей $\langle r \rangle$, составляет 14,9 Å при среднем отклонении $\Delta r = 1,2$ Å.

Анализ показывает, что гликозидный угол χ для всех трех структур изменяется в пределах 180° - 260° . Следовательно азотистые основания находятся в анти-конформации по отношению к сахарному кольцу, что характерно для В-формы ДНК [9]. По полученным значениям фазового угла псевдовращения (рисунок 5) можно оценить изменения конформации дезоксирибозы. Для всех расчетных структур дуплекса 24-мерной нуклеотидной последовательности наблюдаются существенные вариации значений угла ρ вдоль цепи при среднем значении этого угла во всех расчетных структурах $\approx 125^\circ$, что соответствует C1'-экзо-конформации, близкой к C2'-эндо-конформации (В-форме ДНК).

Таким образом, проведенные расчеты методами молекулярной механики позволили выявить ряд низкоэнергетических структур олигонуклеотидного дуплекса – участка связывания с ферментом Топоизомераза II, которые могут быть реализованы при заданных условиях. Анализ данных свидетельствует

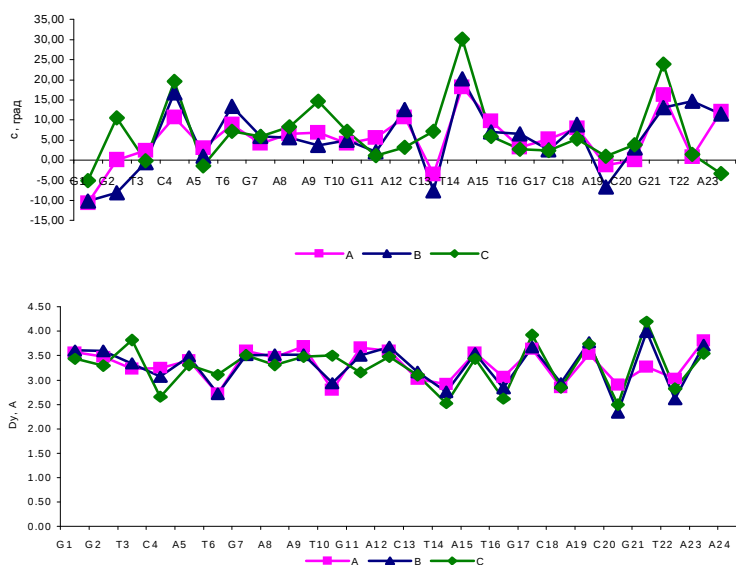


Рисунок 4 – Локальные значения угла открытия пар ρ и линейное смещение пар оснований относительно друг друга вдоль продольной оси пары D_y

о достаточно сильной гетерогенности конформационных параметров спирали, зависящей от последовательности нуклеотидов в цепи. Изменения конформационных параметров исследуемого дуплекса 24-мера, в целом, согласуются с данными других исследований, полученных на основании рентгеноструктурного анализа и ЯМР-эксперимента.

Библиографический список

1. Исследование пространственной структуры дуплекса дезоксиоктануклеотида d(GpApCpApTpC) методами молекулярной механики с использованием данных 2М-ЯМР спектроскопии / А.В. Семанин, А.С. Рубан, Л.Н. Дымант, А.Н. Веселков // Вест. Сев ГТУ. Физика и математика. — Севастополь, 2004. — Вып. 59. — С. 65 – 77.
2. Brunger A.T. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR/ A.T. Brunger // Yale: Univ. Press. — 1992. — 382 p.
3. NAMD 2: Greater scalability for parallel molecular dynamics / L. Kale, R. Skeel, M. Bhandarkar et al. // J. Comp. Phys. — 1999. — V. 154. — P. 283 – 312.
4. MacKerell Jr.A.D. and Banavali N. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: Application to Molecular Dynamics Simulations of DNA and RNA in Solution/ Jr.A.D. MacKerell, N. Banavali // J. Comp. Chem. — 2000. — V. 21. — P. 105–120.
5. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura et al. // J. Chem. Phys. — 1983. — V. 79. — P. 926–935.
6. Humphrey W. VMD- Visual Molecular Dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // J. Molec. Graphics. — 1996. — V. 14.1. — P. 33–38.
7. Dickerson R. DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality / R. Dickerson // Nucleic Acids Research. — 1998. — № 8. — V. 26. — P. 1906– 1926.
8. Culladine C.R. Mechanism of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA / C.R. Culladine // J. Molec. Biol. — 1982. — V. 161. — P. 343–352.
9. A standard Reference Frame for the Description of Nucleic Acid Base-pair Geometry / W.K. Olson, M. Bansal, S.K. Burley et al. // J. Molec. Biol. — 2001. — V. 313. — P. 229 – 237.

Поступила в редакцию 30.06.2005 г.