

УДК 577.113:577.32

В.В. Костюков, канд. физ.-мат. наук, ст. преп.

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: Viktor_Kostukov@mail.ru

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ШПИЛЕЧНЫХ ФОРМ
ДЕЗОКСИГЕКСАНУКЛЕОТИДАМИ СЕМЕЙСТВА D(GCXYGC) МЕТОДОМ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

Моделирование молекулярной динамики шпильчатых форм гексамеров семейства d(GCXYGC) с произвольной последовательностью динуклеотидной петли d(XY) позволило сделать вывод об отсутствии принципиальных ограничений на образование таких шпилек в растворе. Обнаружено, что наиболее выгодно образование шпильчатых структур с центральной парой оснований, не содержащей гуанин. В то же время, инверсия или замена нуклеотидов стебля, фланкирующих петлю, делает шпильчатую структуру нестабильной.

Ключевые слова: шпилька ДНК, гексамер, молекулярная динамика, дуплекс

Введение. Стабильность шпилек ДНК является важным фактором их функционирования в клетке [1]. Известно, что стабильность шпильчатой формы олигонуклеотида во многом зависит от конформации петли.

Известно два типа петель из двух нуклеотидов (рисунок 1) [2]. Тип L1 характеризуется стэкинг-взаимодействием двух петлевых оснований с 5'-концевым основанием стебля. К данному типу принадлежат петли с первым пуриновым основанием. В свою очередь, тип L1 включает в себя подтипы L1anti₁ и L1anti₂, имеющие анти-конформацию основания относительно фуранозного кольца (значение гликозидного угла $\chi \sim 180^\circ$) второго петлевого нуклеотида. L1anti₁ характеризуется вертикальным стэкинг-взаимодействием петлевых оснований между собой, в то время как в L1anti₂ первое основание петли участвует в вертикальном стэкинг-взаимодействии с 5'-концевым основанием стебля, а второе не вовлечено в стэкинг.

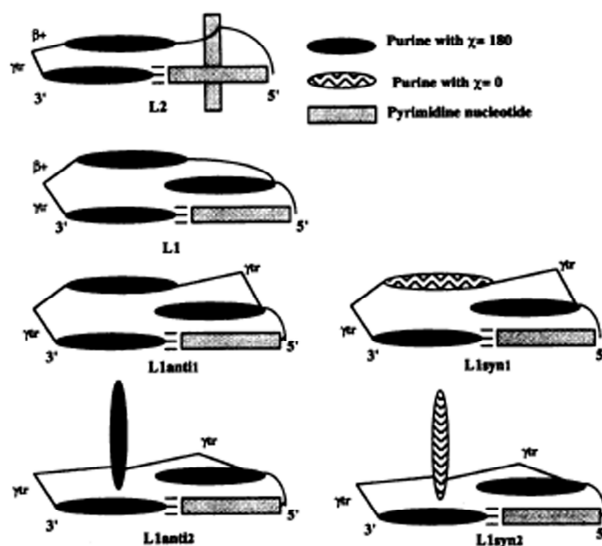


Рисунок 1 – Конформации петель из двух нуклеотидов [2]

Семейства L1syn₁ и L1syn₂ имеют второй петлевой нуклеотид с $\chi \sim 0^\circ$ и различаются между собой аналогично L1anti₁ и L1anti₂. Петли второго типа содержат первый пиримидиновый нуклеотид, который укладывается в малую канавку стебля. При этом второй нуклеотид участвует в стэкинг-взаимодействии с основанием 5'-конца стебля. Обоим типам петель соответствуют конформации +гош(β), +транс(γ) остова 3'-концевого нуклеотида стебля, замыкающего петлю [2].

Влияние на стабильность шпильки последовательности петли из двух нуклеотидов систематически не изучалось. Выявлено, что шпилька с петлей из пиримидиновых (CC) оснований имеет большую температуру плавления по сравнению со шпильчатой структурой с пуриновой (GG) петлей [2]. Авторы объясняют этот факт меньшими стерическими препятствиями для формирования энергетически выгодной конформации петли шпильки в случае пиримидиновых оснований по сравнению с более

объемными пуриновыми. При этом структуры петель не были определены с достаточной точностью методом ЯМР-спектроскопии ввиду их значительной подвижности, однако установлено, что обе петли принадлежат к типу L1.

В работе [3] исследованы шпильки с нуклеотидной последовательностью вида $d(CGC\text{-}XY\text{-}GCG)$ с петлей $XY = GT, TA, AC, AA, TC, CT$. Температуры плавления данных шпилек представлены в таблице 1. Шпильки с пиримидиновыми петлями TC и CT (типа L2) наиболее стабильны среди данных структур вследствие взаимодействия первого петлевого основания со стеблем путем укладки в его малую канавку. Также обнаружено, что шпилька с пурин-пиримидиновой (AC) петлей стабильнее шпильки с пурин-пуриновой (AA) петлей, и обе петли относятся к типу L1 [2]. Однако причины этого отличия, а также различных величин T_m шпилек с другими петлями – пурин-пиримидиновой GT и пиримидин-пуриновой TA – не были установлены.

Таблица 1 – Значения температур плавления шпилечных форм октамеров $d(CGC\text{-}XY\text{-}GCG)$ [3]

Петля XY	T_m , К
GT	332
TA	321
AC	326
AA	320
TC	328
CT	328

Существенную роль в стабильности шпилечных структур могут играть внутримолекулярные водородные связи. В настоящее время в двухнуклеотидных петлях не обнаружено водородных связей между петлевыми основаниями. В то же время, в петлях с тремя и более нуклеотидами Н-связи в неканонических парах оснований в петле играют важную роль в стабилизации шпилечных структур. Хотя неканонические пары оснований нуклеиновых кислот изучены достаточно подробно, рассмотренные случаи не включают последовательного (соседнего) расположения соответствующих нуклеотидов. В настоящее время Н-связи между соседними парами оснований (G:C и G:G) обнаружены экспериментально только в РНК для донорно-акцепторных пар атомов С-О.

В случае динуклеотидной петли существенную роль могут играть конформации петлевых нуклеотидов, определяемые величинами их гликозидных углов χ (см. рисунок 1) [2]. При этом вероятность образования гексамерной шпильки также определяется конформационными свойствами соответствующего мономера.

В настоящей работе с целью выяснения вероятности образования и стабильности шпилек семейства дезоксигексануклеотидов $d(GCXYGC)$ со всеми возможными комбинациями нуклеотидов в динуклеотидной петле XY проведен теоретический анализ данных структур методами молекулярной динамики.

Методы. Пространственные структуры комплексов мутагенов с ДНК построены методом молекулярной механики с помощью программы X-PLOR, версия 3.1 [4]. Задание водного окружения производилось явно, с использованием молекул воды модели TIP3P, размещенных в кубическом боксе с длиной ребра 35 Å (1423 молекулы). Нейтрализация зарядов фосфатов гексамерных шпилек ДНК выполнялась при помощи 5 ионов Na^+ , размещенных на расстояниях 6 Å от атомов фосфора на биссектрисах углов O1P-P-O2P.

В качестве исходных конформаций мономерных форм в процедуре молекулярной динамики (МД) были взяты одинарные спирали В-типа, т.е. все нуклеотиды этих структур имели анти-конформацию. В то же время, начальные конформации петлевых нуклеотидов шпилечных форм гексамеров $d(GCXYGC)$ находились как в анти- ($\chi = 144^\circ$), так и в син-конформациях ($\chi = 324^\circ$) с целью получения максимального набора возможных структур динуклеотидных петель и выяснения их конформационной изменчивости. При этом дуплексы стеблей шпилек $d(GC)_2$ соответствовали В-форме ДНК. Таким образом, исходными для моделирования МД являлись 16 мономерных $d(GCXYGC)$ и 64 шпилечных структуры гексамеров $d(GC\text{-}X_{anti/syn}Y_{anti/syn}\text{-}GC)$.

Оптимизация геометрии шпилечных структур проводилась путем минимизации потенциальной энергии методом сопряженных градиентов. На первой стадии минимизации атомы растворенных веществ фиксировались, для улучшения релаксации ближайших к ним молекулам воды к равновесным положениям. Второй этап проводился без каких либо ограничений на движение атомов.

После минимизации потенциальной энергии выполнялась процедура МД по алгоритму Verlet с временным шагом $\Delta t = 2$ ю фс (использовался алгоритм Shake) при постоянной температуре $T = 298$ К в течение 80 пс. В процессе моделирования МД внешняя водная оболочка фиксировалась для исключения вылета молекул воды в окружающий вакуум. Нефиксированный водный слой соответствовал толщине

ближней гидратной оболочки – бимолекулярному слою в ≈ 4 Å. Координаты всех атомов сохранялись через каждую 1 пс.

Гидратационные индексы, т.е. средние количества молекул воды, формирующих водородные связи с электроотрицательными атомами (N, O) молекул ДНК и лигандов, рассчитывались по траекториям теплового движения в течение последних 40 пс молекулярной динамики. Наличие Н-связи фиксировалось в случае, если расстояния между гидрофильными атомами молекул и атомами кислорода (водорода) воды не превышали 3.2 (2.4) Å, соответственно [5].

Результаты и обсуждение

Анализ стабильности шпильчатых структур семейства d(GC-XY-GC) в растворе

Проведенный выше анализ факторов, влияющих на стабильность шпильчатых структур нуклеиновых кислот в растворе, позволил выделить из них те, которые имеют, на наш взгляд, наибольшее значение при образовании шпильчатой формы короткого дезоксиолигонуклеотида из мономера:

- гидрофобные взаимодействия и гидратация;
- горизонтальные стэкинг-взаимодействия между азотистыми основаниями в стебле шпильки;
- вертикальные стэкинг-взаимодействия между всеми основаниями шпильчатой формы;
- изменение энергии внутримолекулярных взаимодействий в дезоксигексануклеотиде при переходе мономер-шпилька;
- водные мостики шпильчатой структуры;
- конформационная гибкость сахаро-фосфатного остова мономера.

Поиск наиболее вероятных конформаций шпильчатых структур осуществлялся методом последовательного исключения структур с использованием следующих критериев:

- оценка гидрофобных взаимодействий проводилась по разности общей гидратации (общего гидратационного индекса) мономерной и шпильчатой форм гексамеров $\Delta N_0 = N_{0M} - N_{0L}$. Переход мономер-шпилька считался гидрофобно выгодным в случае $\Delta N_0 > 0$; в противном случае структура исключалась из рассмотрения;

- интенсивность горизонтальных стэкинг-взаимодействий в стеблях шпильки определялась сравнением значений их полной энергии $E_{\text{stemHorTotal}}$ каждой из четырех возможных исходных конформаций шпильки данной гексамерной последовательности. При этом конформеры с наименьшими по абсолютной величине значениями $E_{\text{stemHorTotal}}$ считались энергетически невыгодными. Аналогично, по величине ван-дер-ваальсовой энергии E_{vertVdWL} оценивались вертикальные стэкинг-взаимодействия между всеми основаниями шпильчатых структур гексамеров;

- энергетическая выгодность перехода мономер-шпилька определялась по разности соответствующих полных энергий внутримолекулярных взаимодействий $\Delta E_{\text{total}} = E_{\text{totalM}} - E_{\text{totalL}}$. Энергетически выгодным является процесс перехода с $\Delta E_{\text{total}} > 0$. Структуры с $\Delta E_{\text{total}} < 0$ исключались из рассмотрения;

- поскольку водные мостики могут иметь большое значение для стабильности вторичных структур нуклеиновых кислот в растворе, в пределах четырех возможных конформеров шпильки данной гексамерной последовательности невыгодными считались конформации, имеющие наименьшее количество водных мостиков;

- и, наконец, при анализе шпильчатых конформеров семейства d(GC-XY-GC) маловероятным считалось образование шпильчатой формы гексануклеотидной последовательности, три или все четыре конформации которой оказались невыгодными по указанным выше критериям.

На основании описанных критериев было проведено последовательное исключение наименее стабильных структур. В результате установлено, что выгодность образования шпильчатых структур дезоксигексануклеотидными последовательностями d(GC-XY-GC) убывает в ряду XY = (CT, AG, AT, AA, TT, CA, TC, CC, AC, TA). Следовательно, наличие гуанозинового основания в третьем и (или) четвертом нуклеотиде гексамера является, по всей вероятности, препятствием для образования шпильки. Возможной причиной этого, на наш взгляд, являются стерические ограничения конформации петли, накладываемые размещением в ней объемного гуанозинового основания. К такому выводу также приходят и авторы работы [3], объясняя более низкое значение температуры плавления T_m шпильки с петлей GG по сравнению со шпилькой, имеющей петлю CC при том же стебле. Исключение из расчетного ряда стабильности составляет лишь дезоксигексануклеотид d(GCAGGC), повышению стабильности которого может способствовать образование Н-связи N3(A3) – N2(G4) (наблюдавшейся в минимизированной по энергии структуре шпильки, но разорванной в ходе МД). На понижение стабильности шпильки при наличии в ее петле пуриновых оснований, более объемных в сравнении с пиримидиновыми, указывает и то, что в приведенном выше ряду предпочтительных петлевых последовательностей XY только две (AG и AA) из десяти являются пурин-пуриновыми. Отметим также, что в ранних экспериментальных исследованиях октамерных шпильек d(CGC-XY-GCG) (см. таблицу 1) все последовательности петель, кроме AA, не являются пурин-пуриновыми. Фактором, увеличивающим

стабільність шпильки с петлей AA, может являться вертикальное стэкинг-взаимодействие аденозиновых оснований между собой и (или) с основаниями стебля, которое является одним из наиболее интенсивных. Вместе с тем, среди исследованных в работе [3] октамерных шпилек d(CGC-XY-GCG) шпильчатая структура d(CGC-AA-GCG) имеет наименьшую величину T_m (см. таблицу 1).

Как упоминалось выше, существенное значение для стабильности шпильчатых форм могут иметь связи между петлевыми основаниями. В расчетных структурах шпилек семейства d(GC-XY-GC) действительно обнаружены такие Н-связи, а также водородные связи между основаниями петли и стебля и между остовом петли и ее азотистым основаниями (таблица 2). Однако, в целом, их количество весьма мало по сравнению с общим числом шпильчатых конформеров.

Таблица 2 – Расчетные водородные связи оснований шпильчатых структур семейства d(GC-XY-GC)

Конформер	Н-связь	Конформер	Н-связь
d(GC-C _{anti} G _{anti} -GC)	N2(G4) – N7(G5)	d(GC-G _{anti} C _{syn} -GC)	N2(G3) – O4'(C4)
d(GC-C _{syn} G _{syn} -CG)	N2(G4) – O6(G5)	d(GC-G _{anti} G _{anti} -GC)	N2(G3) – N7(G4)
d(GC-G _{syn} A _{syn} -GC)	N2(G3) – O2P(G3)	d(GC-T _{anti} A _{anti} -GC)	O2(T3) – N6(A4)
d(GC-G _{anti} C _{anti} -GC)	N2(G3) – O6(G5)	d(GC-T _{syn} A _{anti} -GC)	N3(C2) – N6(A4)

Тем не менее, возможное образование Н-связей между соседними в нуклеотидной цепи основаниями O2(T) – N6(A) (d(GC-T_{anti}A_{anti}-GC)) и N2(G) – N7(G) (d(GC-G_{anti}G_{anti}-GC)), впервые показанное нами в настоящей работе методами МД, может вносить вклад в стабильность шпильчатых структур, по крайней мере, шпильки d(GC-TA-GC), существование которой установлено экспериментально [6,7].

Конформационные параметры семейства шпильчатых структур d(GC-XY-GC)

Расчетные пространственные структуры гексамерных шпилек d(GC-XY-GC) приведены на рисунке 2. Установлено, что конформационные параметры шпильчатых структур, за исключением величин гликозидных углов χ нуклеотидов петли, которые намеренно варьировались для исходных структур, довольно близки между собой (таблица 3).

Таблица 3 – Усредненные по всем конформерам значения углов <A> (град.) шпильчатых форм дезоксигексануклеотидов d(GC-XY-GC) и величины их среднеквадратичных отклонений

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P
	G1								C2							
<A>	-	-	57	116	222	267	212	117	288	148	58	133	198	264	254	142
СКО	-	-	49	18	25	35	30	32	14	10	4	10	26	38	18	34
	X								Y							
<A>	293	160	62	131	222	168	-	140	281	189	57	99	204	240	-	134
СКО	91	46	70	25	52	66	-	35	78	51	73	21	37	60	-	89
	G5								C6							
<A>	266	225	184	108	168	249	277	109	292	166	52	104	292	-	231	95
СКО	98	87	36	14	43	48	15	15	13	19	3	18	13	-	10	40

Наибольшие отклонения указанных углов от средних значений наблюдаются для петлевых нуклеотидов, что объясняется их большей подвижностью в сравнении со стеблевыми [3]. Однако, в целом, конформации всех шпильчатых форм гексамеров семейства d(GCXYGC), за исключением величин гликозидных углов χ петлевых нуклеотидов, являются сходными. Кроме того, как упоминалось выше, из 64 конформеров шпильчатых структур d(GCXYGC) в процессе МД не разрушился ни один. Поэтому можно заключить, что не существует принципиальных стерических ограничений на образование шпильчатой структуры гексамером семейства d(GCXYGC) при произвольной нуклеотидной последовательности XY.

Необходимо отметить, что конформационные параметры гексамерных шпилек d(GC-XY-GC) хорошо согласуются с полученными ранее для других шпильчатых структур с двумя основаниями в петле. Так, согласно расчетам, торсионный угол γ нуклеотида G5, замыкающего петлю из двух нуклеотидов с ее 3'-конца, для подавляющего большинства гексамерных шпилек принимает транс-конформацию, в отличие от –гош в В-ДНК. Такое значение данного угла является характерным для изученных ранее шпилек с динуклеотидной петлей (см. рисунок 1) [2].

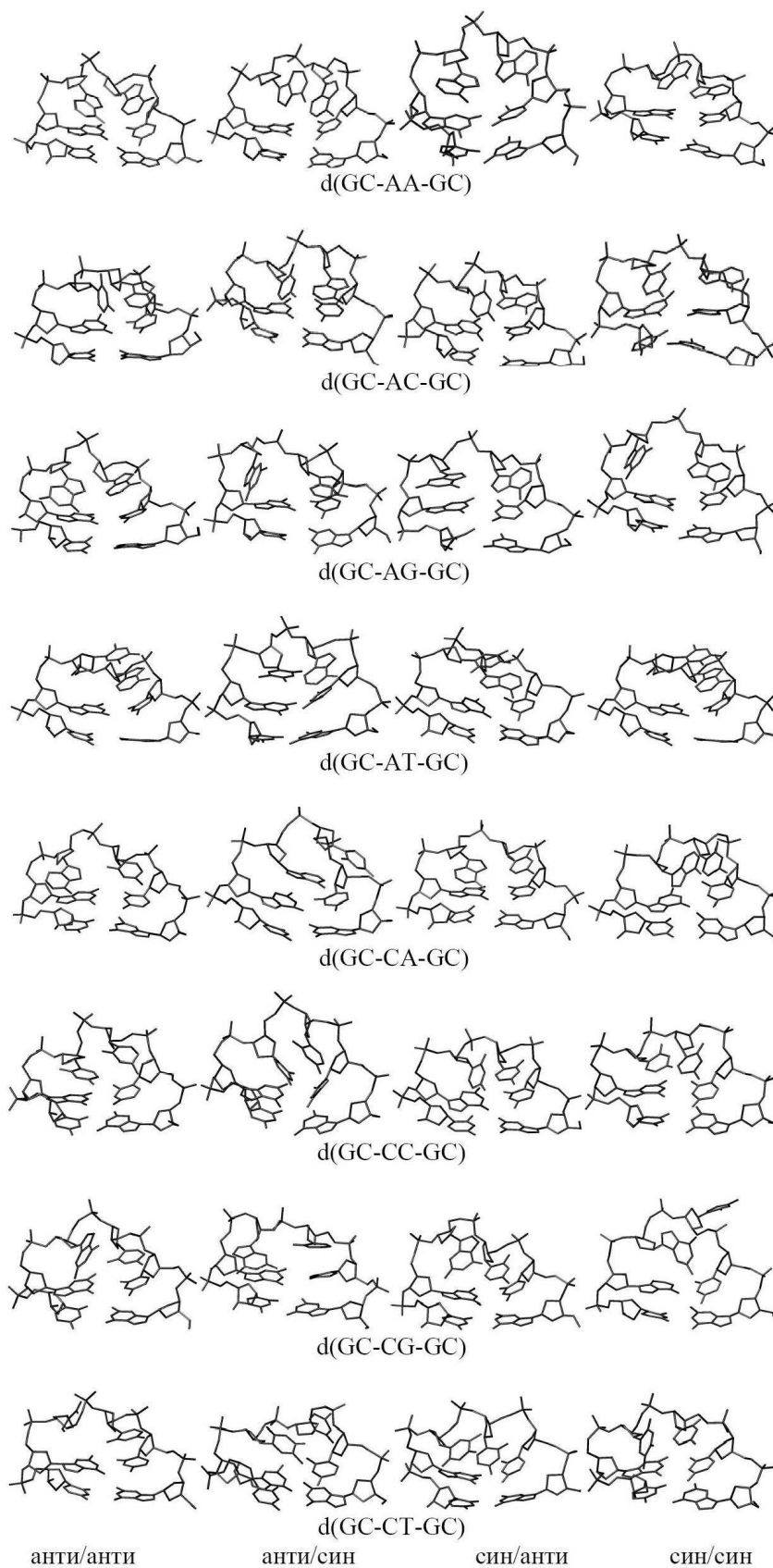
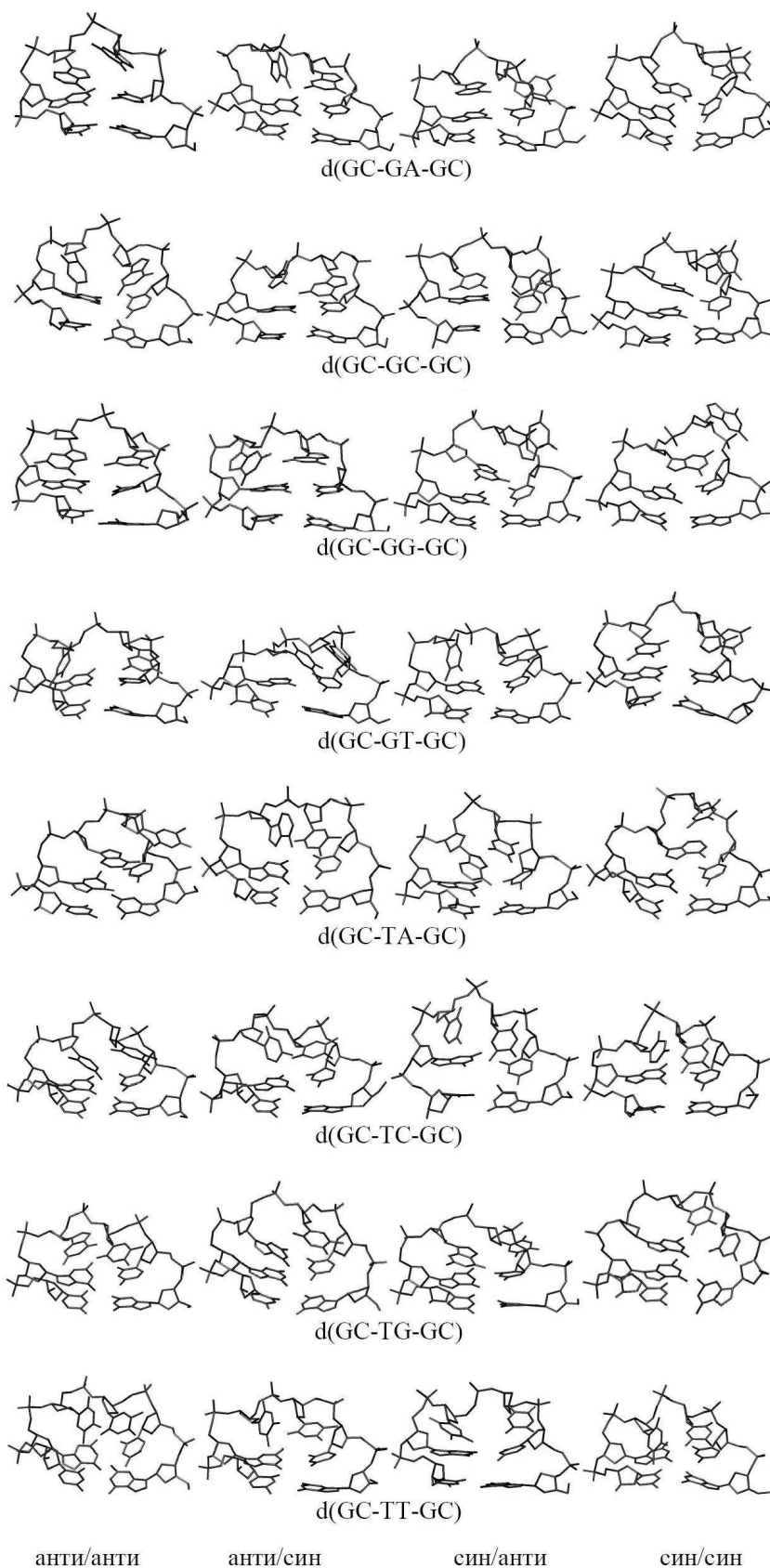


Рисунок 2 – Расчетные пространственные структуры шпильчатых форм гексамеров семейства d(GC-XY-GC) с указанием начальных конформаций петлевых нуклеотидов



Продолжение рисунка 2

Однако, в частности, для $d(\text{GC-T}_{\text{anti}}\text{A}_{\text{anti}}\text{-GC})$ расчетная величина $\gamma = 63^\circ$, что может быть объяснено значительным смещением оснований петли в сторону ее 5'-конца. Величины угла $\beta(\text{G5})$ для шпилек $d(\text{GC-XY-GC})$ имеют как транс, так и +гош-конформации, в то время как в случае $d(\text{CGC-GT-GCG})$ соответствующий угол $\beta(\text{G6})$ принимает конформацию +гош [3].

Стебли гексамерных шпилек по своим конформационным характеристикам близки к VI-форме, что согласуется с [3]. Величина гликозидного угла χ замыкающего петлю нуклеотида G5 может соответствовать как син-, так и анти-конформации. Такой же результат был получен для шпильки с динуклеотидной петлей в работе [2]. Сахарные кольца всех нуклеотидов шпилек проявляют конформационную гибкость, однако близки к C2'-эндо конформации. Это согласуется с данными, полученными для шпилек с двумя основаниями в петле при помощи ЯМР-эксперимента [2,3].

Величины торсионных углов ϵ и ζ петлевых нуклеотидов соответствуют транс-конформации, что не является характерным для В-формы ДНК. Такая же особенность конформации динуклеотидной петли имела место при ранних теоретических исследованиях шпилек ДНК с двумя основаниями в петле [2]. Первое основание петли в большинстве полученных расчетных структур участвует в вертикальном стэкинг-взаимодействии со стеблем, что согласуется с [2]. В то же время, положение второго основания петли может быть существенно различным, что наблюдалось ранее при помощи ЯМР-эксперимента [3].

Величины гликозидных углов χ петлевых нуклеотидов, варьировавшиеся в исходных структурах, для большинства конформеров шпилек семейства $d(\text{GC-XY-GC})$ в процессе МД остались в пределах начальных конформаций (син- или анти-). Это свидетельствует о значительной конформационной изменчивости петель данных гексамерных шпилек, возможные структуры нуклеотидов которых не ограничиваются характерной для В-формы ДНК анти-конформацией. Однако при этом нуклеотиды в 13 из 64 шпилечных форм в процессе МД претерпели конформационные переходы (таблица 4).

Таблица 4 – Конформационные изменения петлевых нуклеотидов шпилечных форм гексамеров семейства $d(\text{GCXYGC})$ в процессе молекулярной динамики

Исходный конформер	Нуклеотид	Переход	Исходный конформер	Нуклеотид	Переход
$d(\text{GC-A}_{\text{anti}}\text{G}_{\text{syn}}\text{-GC})$	G4	син-анти	$d(\text{GC-A}_{\text{syn}}\text{G}_{\text{syn}}\text{-GC})$	G4	син-анти
$d(\text{GC-A}_{\text{syn}}\text{T}_{\text{syn}}\text{-GC})$	A3	син-анти	$d(\text{GC-G}_{\text{anti}}\text{A}_{\text{syn}}\text{-GC})$	A4	син-анти
$d(\text{GC-G}_{\text{syn}}\text{A}_{\text{anti}}\text{-GC})$	G3	син-анти	$d(\text{GC-G}_{\text{syn}}\text{G}_{\text{syn}}\text{-GC})$	G3	син-анти
$d(\text{GC-G}_{\text{anti}}\text{T}_{\text{syn}}\text{-GC})$	T4	син-анти	$d(\text{GC-C}_{\text{anti}}\text{A}_{\text{syn}}\text{-GC})$	A4	син-анти
$d(\text{GC-C}_{\text{anti}}\text{C}_{\text{syn}}\text{-GC})$	C4	син-анти	$d(\text{GC-C}_{\text{anti}}\text{G}_{\text{syn}}\text{-GC})$	G4	син-анти
$d(\text{GC-C}_{\text{anti}}\text{T}_{\text{syn}}\text{-GC})$	T4	син-анти	$d(\text{GC-T}_{\text{anti}}\text{A}_{\text{syn}}\text{-GC})$	A4	син-анти
$d(\text{GC-T}_{\text{syn}}\text{C}_{\text{anti}}\text{-GC})$	C4	анти-син			

Как видно, подавляющее большинство этих изменений приводят к переходу петлевых нуклеотидов в анти-конформацию, которая, как известно, энергетически выгоднее син-конформации. Исключение составляет лишь поворот азотистого основания C4 вокруг гликозидной связи в шпильке с исходной конформацией $d(\text{GC-T}_{\text{syn}}\text{C}_{\text{anti}}\text{-GC})$, что обусловлено стерическими ограничениями на исходную анти-конформацию цитозина со стороны метильной группы тимина. Для проверки соответствия результатов моделирования шпилек семейства $d(\text{GC-XY-GC})$ опыту была проведена также процедура МД для шпилечных форм гексамеров $d(\text{CGCGCG})$, $d(\text{CGTACG})$ и $d(\text{TACGTA})$.

Анализ стабильности шпилечных структур $d(\text{CG-TA-CG})$, $d(\text{CG-CG-CG})$ и $d(\text{TA-CG-TA})$ в растворе

Как упоминалось выше, ЯМР-эксперимент показал, что данные гексамеры не образуют в растворе шпилечных структур [8,9]. Поэтому в случае, если расчетные пространственные структуры шпилек $d(\text{CG-CG-CG})$, $d(\text{CG-TA-CG})$ и $d(\text{TA-CG-TA})$ будут иметь невыгодные параметры по сравнению с расчетными шпилечными формами гексамеров $d(\text{GC-AT-GC})$ и $d(\text{GC-TA-GC})$, существование которых установлено экспериментально [6,7], моделирование МД шпилечных структур по примененной нами методике может быть признано адекватным эксперименту.

Начальные значения гликозидных углов χ петлевых нуклеотидов указанных трех гексамеров соответствовали анти- и син-конформациям. Стебли $d(\text{CG})_2$ и $d(\text{TA})_2$ изначально находились в В-форме ДНК. Исходными для моделирования МД являлись 12 шпилечных форм дезоксигексануклеотидов $d(\text{CG-C}_{\text{anti/syn}}\text{G}_{\text{anti/syn}}\text{-CG})$, $d(\text{CG-T}_{\text{anti/syn}}\text{A}_{\text{anti/syn}}\text{-CG})$ и $d(\text{TA-C}_{\text{anti/syn}}\text{G}_{\text{anti/syn}}\text{-TA})$. Водно-солевое окружение молекул ДНК формировалось по изложенной выше методике. После процедуры минимизации потенциальной энергии для каждой системы проводилась процедура МД в течение 80 пс.

Анализ по приведенным выше критериям конформаций шпилечных форм $d(\text{CG-CG-CG})$, $d(\text{CG-TA-CG})$ и $d(\text{TA-CG-TA})$ показал, что данные шпильки имеют намного худшие параметры внутримолекулярных взаимодействий в сравнении со шпилечными структурами $d(\text{GC-AT-GC})$ и $d(\text{GC-}$

ТА-GC). Из всех 12 конформеров только d(CG-T_{syn}A_{syn}-CG) имеет характеристики, близкие d(GC-AT-GC) и d(GC-TA-GC). Кроме того, в течение моделирования МД при температуре $T = 298$ К для структур d(CG-C_{syn}G_{syn}-CG) и d(TA-C_{anti}G_{anti}-TA) произошел полный разрыв концевых пар оснований стебля с общим разрушением шпильчатых форм. Отметим, что в случае 64 конформеров шпилек семейства d(GC-XY-GC) ни для одного из них не наблюдалось разрушения, и только в случае d(GC-T_{syn}G_{syn}-GC) имел место полный разрыв замыкающей петлю пары оснований. Установлено также, что остальные 10 шпильчатых структур d(CG-CG-CG), d(CG-TA-CG) и d(TA-CG-TA) имеют повышенную по сравнению с d(GC-AT-GC) и d(GC-TA-GC) напряженность сахаро-фосфатного остова петли, что приводит к значительному излому (Buckle) $\kappa \approx 30^\circ \dots 40^\circ$ пури-пиримидиновой пары оснований, замыкающей петлю. При этом наблюдается значительное уменьшение интенсивности как вертикальных стэкинг-взаимодействий между основаниями петли и стебля, так и горизонтального стэкинга в данной паре оснований. В то же время, как упоминалось выше, именно эти взаимодействия играют важную роль в стабильности шпильчатых структур, а наиболее прочным среди динуклеотидных стеблей является d(G:C)₂. Указанные конформационные особенности и являются, на наш взгляд, возможными причинами очень низкой стабильности шпильчатых структур гексамеров d(CGTAACG), d(CGCGCG) и d(TACGTA), не «видимых» в эксперименте [8,9]. Все это позволяет утверждать, что примененные нами методика моделирования МД шпилек семейства d(GC-XY-GC) в растворе и критерии их отбора в целом соответствует данным ЯМР-экспериментов [6-9], несмотря на сравнительно малые времена эволюции моделируемых систем (80 пс).

Выводы. Таким образом, проведенное в настоящей работе моделирование МД шпильчатых форм гексамеров семейства d(GCXYGC) показало отсутствие стерических ограничений на образование таких структур при произвольной нуклеотидной последовательности петли XY. Однако наиболее выгодными является формирование шпильчатых форм из гексамеров d(GCXYGC) при X, Y = (A, T, C). При этом конформационные параметры стебля и петли таких шпильчатых структур хорошо согласуются с полученными ранее экспериментально и теоретически для шпилек с различными динуклеотидными петлями и более длинными стеблями. Полученные результаты могут быть использованы специалистами в области молекулярной биофизики при конформационном анализе коротких олигонуклеотидов.

Бібліографічний список

1. Chou S.-H. Stable Sheared A-C Pair in DNA Hairpins / S.-H. Chou, Y.-Y. Tseng, S.-W. Wang // J. Mol. Biol. — 1999. — Vol. 287. — P. 301–313.
2. Avizonis D.Z. Structural characterization of d(CAACCCGTTG) and d(CAACGGGTTG) mini-hairpin loops by heteronuclear NMR: the effects of purines versus pyrimidines in DNA hairpins / D.Z. Avizonis, D.R. Kearns // Nucleic Acids Res. — 1995. — Vol. 23. — P. 1260–1268.
3. Ippel H.H. Structural similarities and differences between H1- and H2-family DNA minihairpin loops: NMR studies of octameric minihairpins / H.H. Ippel, H. van den Elst, G.A. van der Marel et al. // Biopolymers. — 1998. — Vol. 46. — P. 375–393.
4. Brunger A.T. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR / A.T. Brunger. — Yale: Univ. Press, 1992. — 382 p.
5. Teplukhin A.V. Dependence of the hydration shell structure in the minor groove of the DNA double helix on the groove width as revealed by Monte Carlo simulation / A.V. Teplukhin, V.I. Poltev, V.P. Chuprina // Biopolymers. — 1991. — Vol. 31. — P. 1445–1453.
6. Веселков А.Н. ¹H ЯМР-исследование самоассоциации молекул дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) в водном растворе / А.Н. Веселков, В.И. Пахомов, О.В. Рогова [и др.] // Биофизика. — 2004. — Т. 49. — С. 781–788.
7. Костюков В.В. Структурный и термодинамический анализ конформационных состояний само-комплементарных дезоксигексануклеотидов 5'-d(GpCpApTpGpC) и 5'-d(GpCpTpApGpC) в водном растворе / В.В. Костюков, О.В. Рогова, М.П. Евстигнеев [и др.] // Биофизика. — 2007. — Т. 52. — С. 625–635.
8. Веселков А.Н. ЯМР-исследование самоассоциации молекул дезоксигексануклеотидов 5'-d(CpGpTpApCpG) и 5'-d(CpGpCpGpCpG) в водном растворе / А.Н. Веселков, В.И. Пахомов, Р.Дж. Итон [и др.] // Биофизика. — 2000. — Т. 45. — С. 20–26.
9. Веселков А.Н. ЯМР-анализ термодинамических характеристик самоассоциации молекул дезоксигексануклеотида 5'-d(TpApCpGpTpA) в водном растворе / А.Н. Веселков, В.И. Пахомов, Р.Дж. Итон [и др.] // Доклады НАН Украины. — 2001. — № 3. — С. 95–101.

Поступила в редакцию 13.03.2009 г.