

УДК 577.32

В.В. Костюков, аспирант

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: Viktor_Kostukov@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ШПИЛЕЧНЫХ ФОРМ ГЕПТАНУКЛЕОТИДОВ d(GCGAAGC) И r(GCGAAGC) МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Шпилечные формы гептануклеотидов d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC) исследованы методами молекулярной динамики в водно-солевом растворе при температуре 298 К. Моделирование проведено во временном диапазоне до 2 нс. Вычислены пространственные структуры шпилек, конформационные параметры, выявлены факторы стабильности шпилечных форм олигонуклеотидов. Определены вклады различных типов атомных взаимодействий в общую устойчивость шпилек. Рассчитаны гидратация и подвижность элементов шпилечных структур.

Введение. Шпилечные структуры нуклеиновых кислот играют важную роль при взаимодействии с белками, являясь местами узнавания в процессах репликации и транскрипции [1,2]. При этом большое значение имеет стабильность шпилек ДНК и РНК как одно из основных условий их функционирования в клетке. Детальное изучение шпилечных форм целесообразно определять на коротких фрагментах нуклеиновых кислот, способных формировать шпильки в растворе. При этом устойчивость шпилечных форм характеризуется, как правило, температурой плавления и стойкостью к действию нуклеаз [3]. Устойчивость шпилек при идентичных экспериментальных условиях определяется их нуклеотидными последовательностями и конформациями. Поэтому выяснение пространственной организации шпилечных структур необходимо для понимания их стабильности и, как следствие, возможности выполнения определенных функций в клетке.

В настоящее время известно, что шпильки дезоксирибо- и соответствующих рибоолигонуклеотидов обладают существенно различной устойчивостью. Так, шпилька d(GCGAAGC) с петлей GAA ($T_m \approx 77^\circ\text{C}$) намного более стабильна, чем шпилька r(GCGAAGC) ($T_m \approx 27^\circ\text{C}$) [3], в то время как шпилечная форма дезоксирибонуклеотида 5'-d(GGACTTCGGTCC)-3', содержащая петлю TTCC, имеет температуру плавления $T_m \approx 60^\circ\text{C}$ по сравнению $T_m \approx 76^\circ\text{C}$ для соответствующей шпилки РНК [4].

В то время как пространственная структура шпилечной формы дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) установлена на основе данных ЯМР-спектроскопии [3,5], шпилька соответствующего рибонуклеотида остается практически не изученной и требует проведения экспериментальных и теоретических исследований. В настоящей работе методами молекулярной динамики (МД) проведен сравнительный анализ шпилечных структур гептануклеотидов d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC).

Методы. Расчет пространственных структур и конформационной динамики шпилек гептануклеотидов выполнен при помощи программы X-PLOR [6] с силовым полем CHARMM27 [7]. Для представления ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий использовались переключающая (switch) и сдвиговая (shift) функции, соответственно, с расстоянием усечения $r_{\text{cut}} = 12 \text{ \AA}$. Конформационные параметры стартовых конфигураций стеблей шпилечных форм гептамеров d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC), состоящих из двух G:C пар, отвечали классическим В- и А-формам нуклеиновых кислот, соответственно. Начальные конформации петель обеих шпилек выбирались так, чтобы, согласно [3,5], азотистые основания петель G3 и A5 образовывали неканоническую (sheared) пару, а положение неспаренного основания A4 соответствовало вертикальному стэкинг-взаимодействию с G3. Таким образом, стартовая для МД пространственная структура шпилки рибогептамера была сформирована аналогично d(GCGAAGC), ввиду отсутствия экспериментальных данных о ее конформации. Олигонуклеотидные цепи терминировались с 5'- и 3'-концов ОН-группами. Нейтрализация избыточных электрических зарядов фосфатов в гептамерах обеспечивалась шестью ионами Na^+ , расположенных в стартовых конфигурациях на расстояниях $6 \text{ \AA}$ от атомов фосфора вдоль биссектрис углов O1P-P-O2P. Водное окружение моделировалось молекулами воды TIP3P, размещенными в кубических боксах с ребром $35 \text{ \AA}$, первоначально содержащих по 1432 молекул воды. При совмещении центров масс водного бокса и ДНК (РНК) удалялись все молекулы воды, атомы кислорода которых находились на расстояниях, меньших $2,7 \text{ \AA}$, от неводородных атомов гептамеров и ионов Na^+ . В результате моделируемые системы содержали 1261 и 1252 молекул воды, соответственно. Оптимизация геометрии шпилек осуществлялась путем минимизации потенциальной энергии молекулярных систем. Диэлектрическая проницаемость среды принималась равной единице. На первом этапе минимизации фиксировались положения всех атомов шпилечных структур и ионов Na^+ для ускорения релаксации водного окружения к равновесному состоянию, второй этап минимизации проводился с фиксацией только атомов гептамеров. На окончательном этапе оптимизация геометрии проводилась без каких-либо ограничений на движения атомов. После минимизации потенциальной энергии систем рассчитывалась

МД по алгоритму Verlet [8] при постоянной температуре $T=298\text{ К}$ с временным шагом $\Delta t=2\text{ фс}$ и ограничением тепловых движений атомов водорода по алгоритму Shake. Все молекулы воды, находящиеся на расстоянии менее $5\text{ \AA}$ от граней водных боксов, фиксировались для исключения их вылета в вакуум. Свободные водные оболочки имели толщину $\approx 4\text{ \AA}$. Время эволюции для шпилек ДНК и РНК составило 0,64 и 2 нс, соответственно. Координаты атомов записывались через 1 пс. Гидратационные индексы определялись из расчетных траекторий теплового движения атомов как средние количества Н-связей между молекулами воды и гидрофильными атомами гептануклеотидов (N, O) за последние 40 пс МД. Наличие Н-связи фиксировалось, если расстояния между электроотрицательным атомом гептамера и атомами кислорода и водорода молекулы воды не превышали 3,2 и 2,4 $\text{\AA}$, соответственно. По указанному критерию водородной связи определялось также наличие водных мостиков, связывающих гидрофильные атомы шпилечных структур.

Для проверки адекватности данной методики моделирования проведено сравнение конформационных параметров расчетной и усредненной по 14 структурам (Protein Data Bank ID 1PQT), полученных на основе данных ЯМР-эксперимента [5], шпилек дезоксигептануклеотида. Визуализация молекулярных систем проводилась с помощью программы VMD.

Результаты и их обсуждение. Рассчитанные в ходе МД шпилечные структуры показаны на рисунке 1.

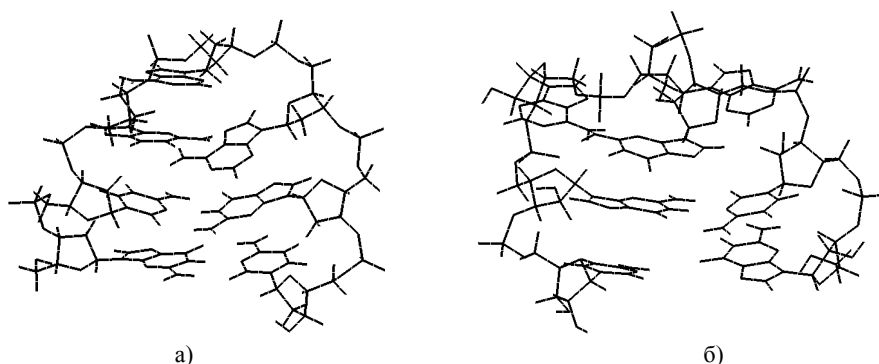


Рисунок 1 – Расчетные шпилечные структуры d(GCGAAGC) (a) и r(GCGAAGC) (б)

Вычисленная пространственная структура шпильки d(GCGAAGC) соответствует полученным в [5]. Все межпротонные расстояния согласуются с соответствующими кросс-пиками [5]. При совмещении данных структур методом наименьших квадратов по всем неводородным атомам значение среднеквадратичного отклонения (СКО) составляет 1,23 $\text{\AA}$, в то время как аналогичные СКО для 14 наборов координат относительно усредненного составляют 0,15...0,36 $\text{\AA}$ [5]. Значительные расхождения величин пространственных углов наблюдаются для α , β , γ (A4, A5), γ , δ (G1), ϵ (G3), ζ (G3, A4). Значения гликозидных углов χ в пределах СКО совпадают для всех звеньев. Величины фазовых углов псевдотвращения P согласуются только для петлевых звеньев, что вызвано усечением дальности электростатических взаимодействий r_{cut} при моделировании и особенностями параметров силовых полей CHARMM22 и CHARMM27. Подобные расхождения расчетных и экспериментальных значений P при использовании программы X-PLOR и силового поля CHARMM22 имели место и ранее [4].

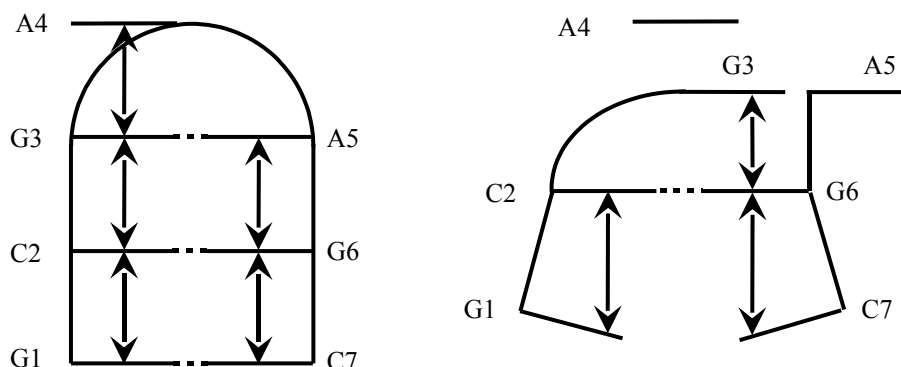
Стебель дезоксигептамера представляет собой хорошо сформированный правоспиральный динуклеотидный дуплекс с уотсон-криковским спариванием оснований G:C. Для стебля шпильки РНК наблюдается расхождение терминальных азотистых оснований, т.е. образования концевой G1:C7 пары не происходит. Таким образом, положения оснований G1 и C7 стабилизируются, в основном, за счет вертикального стэкинг-взаимодействия с основаниями C2 и G6, формирующими единственную устойчивую пару оснований в данной структуре. Петли шпилек также принимают существенно различные конформации (рисунок 2).

В гептамере d(GCGAAGC) сохраняется неканоническая G3:A5 пара с расположением неспаренного основания A4 над G3 и вертикальным стэкинг-взаимодействием между ними. При этом основания G3 и A5, в свою очередь, участвуют в вертикальном стэкинге с основаниями C2 и G6, соответственно [3,5]. В шпилечной форме r(GCGAAGC) на участке нуклеотида A4 сахаро-фосфатный остов имеет довольно резкий петлеобразный выступ в сторону большой канавки. Поэтому в случае шпильки РНК оба адениновых основания фактически выступают в раствор, и их положения практически не стабилизируются. При этом основание нуклеотида G3 расположено между фуранозным кольцом A4 и основанием звена G6, участвуя в вертикальном стэкинг-взаимодействии с последним. Таким образом, шпилька ДНК принимает исключительно компактную конформацию [3,5], в то время как шпилечная форма рибогептануклеотида имеет весьма «рыхлую», неупорядоченную структуру.

Наиболее подвижными пространственными углами сахаро-фосфатного остова в дезоксигептануклеотиде являются α (A4, G6), β (C2, C7), ϵ (G3), ζ (G1, A5), а наименее – β (G6),

$\chi(G1, A5, C7)$, $\delta(C2, G3, A4)$ (таблица 1). В случае $r(GCGAAGC)$ наибольшие значения СКО имеют α , β , $\gamma(A5)$, $\delta(A4)$, $\epsilon(G1)$, $\zeta(C2)$, а наименьшие – $\alpha(A4)$, $\beta(G6)$, $\gamma(C2)$, δ , $\epsilon(G3)$, $\zeta(A4)$. Наиболее подвижным гликозидным углом в для обеих структур является $\chi(G1)$ в силу его терминального положения, а наименее – нуклеотида C2 как образующего уотсон-криковскую пару. Из фазовых углов псевдворращения для $d(GCGAAGC)$ сильнее остальных изменяется $P(G1)$, а наименее – $P(G6)$, для рибогептамера – $P(A4)$ и $P(G3)$, соответственно.

а) б)
Рисунок 2 – Схемы шпильчатых структур и $d(GCGAAGC)$ (а) и $r(GCGAAGC)$ (б).
Пунктиром показаны водородные связи, стрелками – вертикальные стэкинг-взаимодействия



В процессе МД большинство значений пространственных углов дезоксигептануклеотида изменяются мало, за исключением коррелированных скачкообразных переходов δ и ζ звеньев G1, δ , χ и ζ A5, а также δ , χ и ζ G6. Отметим, что, согласно [5], в процессе МД без ограничений на движение атомов между собой коррелируют изменения углов $\zeta(A4)$, α и $\gamma(A5)$ шпильки дезоксирибогептануклеотида.

Таблица 1 – Усредненные за последние 40 пс МД значения торсионных углов (град.) сахаро-фосфатного остова, гликозидных углов и фазовых углов псевдворращения сахарных колец шпильчатых структур $d(GCGAAGC)$ и $r(GCGAAGC)$

	G1	C2	G3	A4	A5	G6	C7
$d(GCGAAGC)$							
α	-	295,7 $\pm$ 9,5	298,5 $\pm$ 9,9	95,2 $\pm$ 17,9	286,7 $\pm$ 11,1	287,9 $\pm$ 12,7	300,7 $\pm$ 9,8
β	-	146,0 $\pm$ 11,2	158,4 $\pm$ 9,9	241,2 $\pm$ 11,7	127,5 $\pm$ 7,9	118,5 $\pm$ 6,6	166,0 $\pm$ 10,4
γ	51,2 $\pm$ 10,3	62,3 $\pm$ 6,7	64,7 $\pm$ 7,6	182,8 $\pm$ 8,6	56,0 $\pm$ 6,2	81,0 $\pm$ 12,6	60,7 $\pm$ 7,1
δ	88,3 $\pm$ 15,5	82,8 $\pm$ 4,5	141,5 $\pm$ 6,5	146,9 $\pm$ 8,3	136,8 $\pm$ 6,7	80,9 $\pm$ 7,0	139,7 $\pm$ 7,8
ϵ	189,7 $\pm$ 14,9	225,8 $\pm$ 7,9	236,8 $\pm$ 20,9	194,2 $\pm$ 9,2	203,6 $\pm$ 10,7	195,1 $\pm$ 11,4	-
ζ	256,1 $\pm$ 19,2	301,1 $\pm$ 8,8	169,8 $\pm$ 15,6	168,0 $\pm$ 9,6	221,1 $\pm$ 15,8	283,7 $\pm$ 9,3	-
χ	246,6 $\pm$ 14,1	219,1 $\pm$ 8,0	274,1 $\pm$ 8,5	214,8 $\pm$ 9,5	290,0 $\pm$ 10,2	215,4 $\pm$ 9,5	232,8 $\pm$ 10,4
P	77,5 $\pm$ 22,4	26,8 $\pm$ 12,7	147,9 $\pm$ 9,3	160,1 $\pm$ 13,6	146,2 $\pm$ 8,4	25,9 $\pm$ 8,2	150,5 $\pm$ 11,4
$r(GCGAAGC)$							
α	-	124,0 $\pm$ 9,8	138,1 $\pm$ 10,4	133,2 $\pm$ 6,9	308,3 $\pm$ 13,6	152,4 $\pm$ 7,2	299,5 $\pm$ 8,1
β	-	229,8 $\pm$ 9,2	192,7 $\pm$ 11,1	236,7 $\pm$ 8,7	199,7 $\pm$ 12,0	258,4 $\pm$ 7,2	155,5 $\pm$ 7,5
γ	59,4 $\pm$ 6,4	164,3 $\pm$ 4,3	189,1 $\pm$ 6,7	184,6 $\pm$ 5,7	303,3 $\pm$ 8,7	171,0 $\pm$ 4,5	55,7 $\pm$ 5,5
δ	82,4 $\pm$ 4,8	85,2 $\pm$ 4,9	80,0 $\pm$ 4,3	152,3 $\pm$ 5,3	83,8 $\pm$ 4,4	89,1 $\pm$ 4,8	135,7 $\pm$ 5,2
ϵ	231,0 $\pm$ 9,1	210,5 $\pm$ 8,4	229,4 $\pm$ 5,4	224,3 $\pm$ 7,5	214,6 $\pm$ 6,3	231,4 $\pm$ 6,5	-
ζ	271,3 $\pm$ 8,6	292,5 $\pm$ 9,1	306,6 $\pm$ 5,5	96,1 $\pm$ 5,1	296,1 $\pm$ 6,2	284,6 $\pm$ 7,5	-

χ	184,2 $\pm$ 9,7	192,1 $\pm$ 5,2	159,4 $\pm$ 5,3	213,4 $\pm$ 7,4	197,8 $\pm$ 9,1	214,4 $\pm$ 5,8	247,8 $\pm$ 7,2
P	5,5 $\pm$ 9,6	357,5 $\pm$ 9,6	2,0 $\pm$ 5,4	175,2 $\pm$ 11,6	358,4 $\pm$ 6,5	356,5 $\pm$ 7,5	150,7 $\pm$ 8,4

Примечание: после знака « $\pm$ » приведены значения СКО

В случае $r(\text{GCGAAGC})$ конформационные параметры существенно изменяются: наблюдается корреляция между значениями ϵ и ζ C2, α и β G3, ϵ , $\zeta(\text{G3})$ и α , $\beta(\text{A4})$, α , β , γ и χ A5 (рисунок 3), а также сравнительно медленные изменения величин некоторых других пространственных углов при эволюции молекулярной системы в течение МД. Это, в конечном итоге, приводит к значительным конформационным различиям расчетных структур дезоксирибо- и рибогептамеров, поскольку, как упоминалось выше, стартовые для МД конформации шпилек были аналогичными.

В целом, по значениям торсионных углов сахаро-фосфатного остова оба гептамера занимают промежуточное положение между А- и В-формами (см. таблицу 1). В то же время, значения приблизительно трети данных углов, главным образом, в звеньях G3 и A4, для обеих шпилек далеки от канонических.

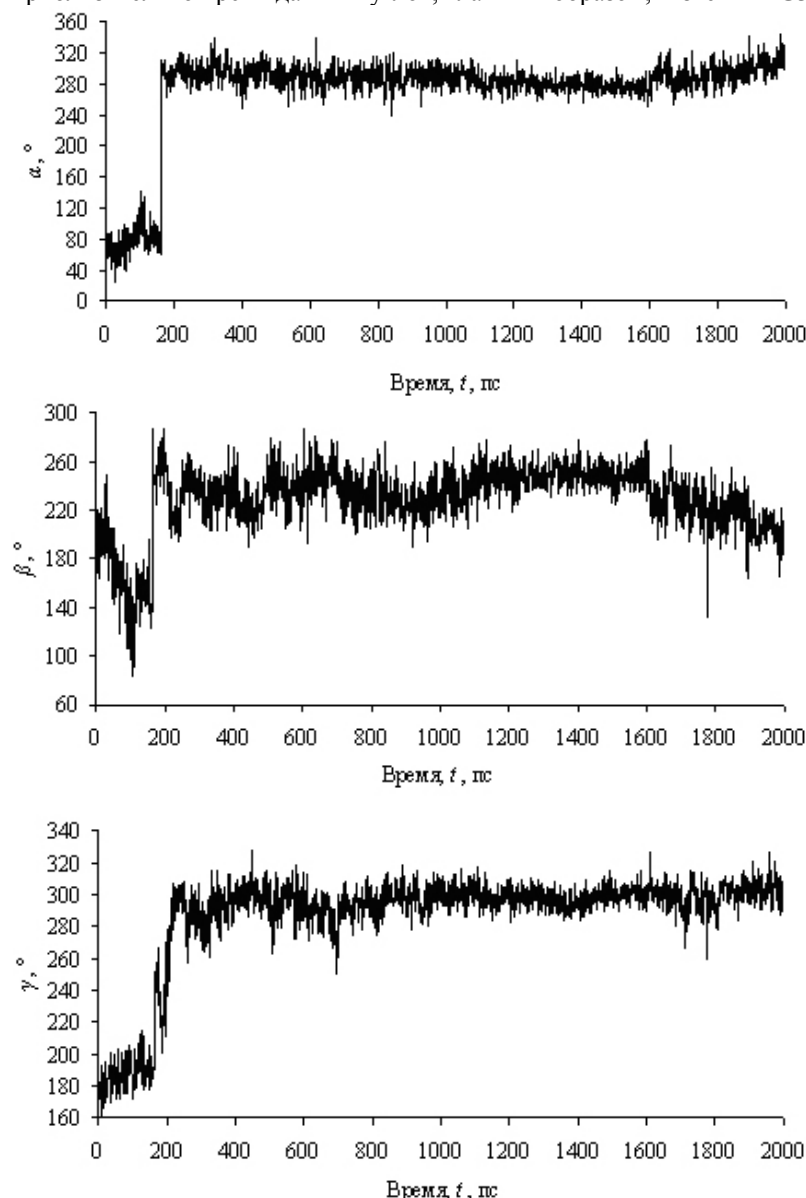


Рисунок 3 – Коррелированные изменения значений пространственных углов сахаро-фосфатного остова звена A5 шпильки $r(\text{GCGAAGC})$

При этом в $d(\text{GCGAAGC})$ углы β всех нуклеотидов, кроме A4, имеют существенно меньшие величины, чем в В-ДНК. Для $r(\text{GCGAAGC})$ углы α принимают значения, намного меньшие канонических, для всех нуклеотидов, кроме C7, а углы γ – значительно превышающие соответствующие для А- и В-форм. Сравнение значений пространственных углов остовов шпилек между собой показывает, что наибольшие различия имеют величины γ , и, в меньшей степени, α и β , в то время как δ , ϵ , и ζ , за исключением $\zeta(\text{G3})$, принимают сравнительно близкие значения для обоих гептамеров.

Величины гликозидных углов χ дезоксирибогептамера, кроме звеньев G3 и A5, образующих неканоническую пару, соответствуют син-конформации [5]. В случае $r(\text{GCGAAGC})$ величины χ для всех нуклеотидов принадлежат син-конформации. Величины фазовых углов псевдовращения P для звеньев обеих шпилек близки к каноническим значениям А- и В-форм. Исключение составляет лишь значение $P(\text{G1})$ шпильки $d(\text{GCGAAGC})$, соответствующее O1'-эндо конформации. При этом конформации фуранозных колец звеньев G3, A4, A5 и C7 дезоксигептамера близки к В-ДНК, а нуклеотидов C2 и G6 – А-

ДНК. В случае $r(\text{GCGAAGC})$ сахарные кольца звеньев G1, C2, G3, A5 и G6 в большей степени соответствуют А-форме, а A4 и C7 – В-форме.

Таким образом, анализ конформационных параметров шпильчатых форм показывает, что только конформации сахарных колец в значительной мере соответствуют В-форме для шпильки ДНК и А-форме

– для шпильки РНК. При этом значения пространственных углов сахаро-фосфатного остова и гликозидных углов стеблей и петель шпилечных структур соответствуют как А-, так и В-формам, и также могут быть весьма далекими от канонических. Можно предположить, что для данных малых шпилечных форм ДНК и РНК конформации сахаров не имеют такого влияния на остальные конформационные параметры, как в одно- и двуспиральных формах нуклеиновых кислот. Вероятно, это обусловлено малыми размерами петель и стеблей этих шпилек, и, как следствие, значительного влияния структурных элементов друг на друга. Даже двуспиральный участок шпильки – стебель – в данном случае состоит всего из двух канонических пар, при этом G1:C7 пара является концевой и поэтому наиболее подвижной [4,9]. Отметим, что в случае стебля из четырех пар нуклеотидов GGAC для шпильки ДНК он соответствует В-форме, а у шпильки РНК – А-форме [4]. На конформацию второй пары C2:G6 оказывает влияние соседняя неканоническая пара петли G3:A5, имеющая в полтора раза меньшее расстояние между атомами O3' ($\approx 10 \text{ \AA}$ вместо $\approx 15 \text{ \AA}$ у C2:G6), характеризующее ширину гликозидного желобка (малой канавки). Для шпильки РНК динуклеотидный дуплекс стебля не сохраняется.

Различная пространственная организация шпилек дезоксирибо- и рибогептануклеотидов существенно влияет на энергии атомных взаимодействий (таблица 2).

Таблица 2 – Расчетные энергии взаимодействий (ккал/моль) шпилечных форм гептамеров d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC)

Взаимодействие	d(GCGAAGC)			r(GCGAAGC)		
	E_{total}	E_{vdw}	E_{elec}	E_{total}	E_{vdw}	E_{elec}
Внутри шпильки	-756,4	-55,1	-813,4	-465,5	-46,2	-548,3
G1 и C2	-16,3	-7,4	-8,9	-3,5	-8,6	5,0
C2 и G3	-9,0	-6,5	-2,5	-7,5	-3,5	-4,0
G3 и A4	-13,8	-10,1	-3,7	0,4	-2,1	2,5
A4 и A5	-2,4	-1,4	-1,0	0,6	-0,1	0,6
A5 и G6	-12,7	-10,1	-2,7	-0,9	-0,8	-0,1
G6 и C7	-18,6	-8,9	-9,7	-17,4	-7,6	-9,8
G1 и C7	-21,5	-1,2	-20,3	4,9	-1,2	6,0
C2 и G6	-25,6	-0,7	-24,9	-25,0	-0,9	-24,0
G3 и A5	-10,0	-0,9	-9,1	-2,8	-2,3	-0,5
G3 и G6	-7,3	-1,3	-6,0	-0,4	-10,3	9,9
Шпильки с водой	-1190,1	-76,4	-1113,7	-1236,1	-55,5	-1180,5

Примечания: E_{total} – общая энергия, E_{vdw} – энергия Ван-дер-Ваальса, E_{elec} – электростатическая энергия. Приведены энергии взаимодействий между некоторыми парами азотистых оснований.

Для d(GCGAAGC) абсолютное значение энергии внутримолекулярных взаимодействий гораздо больше, чем для шпильки рибогептамера, что согласуется с ее значительно большей устойчивостью. Как упоминалось выше, у r(GCGAAGC) контакты, аналогичные имеющим место в дезоксигептануклеотиде, сохраняются только для вертикального стэкинг-взаимодействия между основаниями C2 и G3, G6 и C7. Также практически не изменяется энергия взаимодействий в единственной паре оснований C2:G6. Остальные связи, стабилизирующие шпилечную форму d(GCGAAGC) (рисунок 2), в шпилечной структуре рибоолигонуклеотиде практически не наблюдаются. Вследствие такой «разрыхленности» и выступления адениновых оснований в раствор, а также наличия гидрофильных атомов O2' в сахарных кольцах, модуль энергии взаимодействия с водой у рибонуклеиновой шпильки оказывается несколько выше, чем для d(GCGAAGC).

Сравнение значений СКО (таблица 3) показывает, что, в целом, как мономерная, так и шпилечная формы дезоксигептануклеотида имеют значительно большую конформационную подвижность по сравнению с соответствующими структурами рибогептамера.

Таблица 3 – Среднеквадратичные отклонения структурных элементов мономерных и шпилечных форм гексануклеотидов d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC) ($\text{\AA}$) за последние 40 пс моделирования молекулярной динамики

Вся шпилька	Остов	Основания						
		G1	C2	G3	A4	A5	G6	C7
Мономер d(GCGAAGC)								
0,817	0,786	0,643	0,746	0,911	1,159	1,189	0,680	0,581
Мономер r(GCGAAGC)								
0,494	0,487	0,554	0,561	0,425	0,417	0,507	0,513	0,558
Шпилька d(GCGAAGC)								
0,441	0,434	0,485	0,401	0,445	0,472	0,403	0,405	0,532

Шпилька r(GCGAAGC)								
0,277	0,263	0,338	0,268	0,236	0,331	0,294	0,253	0,333

Меньшая подвижность мономера и шпильки r(GCGAAGC) по сравнению с d(GCGAAGC) коррелируют с хорошо известной из литературных данных большей термодинамической жесткостью полимерной нити РНК по сравнению с ДНК, что связано с особенностями конформаций сахарных колец рибо- и дезоксирибонуклеотидов. По всей видимости, гибкость сахаро-фосфатного остова мономера играет большую роль в образовании коротких шпилек с малыми петлями и стеблями, поскольку в этом случае требуется его значительный изгиб на участке петли, а короткий стебель не обеспечивает достаточной прочности такой малой шпильки. Данное предположение подтверждается результатами работы [4], согласно которым шпилька РНК 5'-r(GGACTTCGGTCC)-3' с достаточно длинным стеблем GGAC/GTCC и петлей TTCG проявляет большую устойчивость по сравнению с соответствующей шпилькой ДНК. Нами также было ранее показано, что более высокая гибкость остова мономера увеличивает стабильность шпилечных форм дезоксигексануклеотидов. Отметим, что в работе [5] экспериментально также выявлена значительная подвижность шпильки d(GCGAAGC), при этом повышенную устойчивость более гибкой структуры авторы объясняют ее энтропийной выгодностью. В работе [4] на основе ЯМР-эксперимента установлена большая гибкость петли дезоксирибонуклеотидной шпильки по сравнению с рибонуклеотидной, при этом ее структура оказалась весьма неупорядоченной, однако не была установлена детально ввиду отсутствия надежных NOE-контактов.

Анализ взаимодействия шпилечных структур с водным окружением (таблица 4) показывает, что, в целом, шпилька рибогептамера более гидратирована, как по остову (ввиду наличия атомов O2'), так и по азотистым основаниям (ввиду их большего выступления в раствор по сравнению с основаниями дезоксирибогептамера).

Таблица 4 – Среднее за последние 40 пс МД количество молекул ближайшей водной оболочки, образующих водородные связи с гидрофильными атомами шпилечных форм

Вся шпилька	Остов	Основания	Стебель	Петля	G1	C2	G3	A4	A5	G6	C7
d(GCGAAGC)											
65	47	20	38	30	8	10	12	12	9	12	11
r(GCGAAGC)											
68	50	23	39	33	12	10	13	13	15	11	15

Из оснований наибольшее количество Н-связей с молекулами воды образуют G1, A5 и C7 вследствие выступления их в раствор. Так, значения гидратационных индексов для атомов N1, N2(G1), N6(A5), O5'(G6), O2(C7) увеличиваются от 0; 0,718; 0,103; 1,308; 0,718 для рибоолигонуклеотида до 0,744; 1,769; 1,846; 2,026; 2,051 в случае d(GCGAAGC). В то же время для атомов O1P, O3'(C2), N2(G3), O2P, O6(G6) их значения уменьшаются от 2,974; 0,923; 0,821; 2,897; 1,026 у r(GCGAAGC) до 1,974; 0; 0; 1; 0,026 для d(GCGAAGC), соответственно.

Расчетные водные мостики между электроотрицательными атомами шпилечных структур представлены в таблице 5. Атомы O2' рибозных колец выделены курсивом. Водные мостики, зафиксированные за последние 40 пс моделирования МД, показаны на рисунке 4.

Таблица 5 – Водные мостики между гидрофильными атомами шпилечных структур гептамеров d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC)

№ п/п	d(GCGAAGC)	r(GCGAAGC)
1	O2P(C2) – N7(G3)	O5'(G1) – O2P(C2)
2	O5'(C2) – O2P(G3)	O2'(G1) – O5'(C2)
3	O2(C2) – N1(A5)	N7(G1) – N3(C7)
4	O5'(G3) – N1(A5)	O2'(C2) – O2(C2)
5	O4'(G3) – N1(A5)	O1P(G3) – N7(A4)
6	N7(G3) – N7(A4)	O2'(G3) – N7(A5)
7	N3(A4) – O2P(A5)	O2'(G3) – N3(G6)
8	O3'(A5) – O4'(G6)	N7(G3) – N3(A4)
9	N3(A5) – O4'(G6)	O6(G3) – O3'(A4)
10	N3(G6) – O4'(C7)	O2'(A4) – O2P(A5)
11	-	O2'(A4) – N3(A4)
12	-	O1P(A5) – O2P(G6)
13	-	O5'(A5) – O3'(A5)
14	-	O2'(G6) – N3(G6)
15	-	O2(C7) – O4'(C7)

Из таблицы 5 видно, что шпилька рибогептамера обнаруживает значительно большее количество водных мостиков, что обусловлено, прежде всего, наличием атомов O2' в ее фуранозных кольцах,

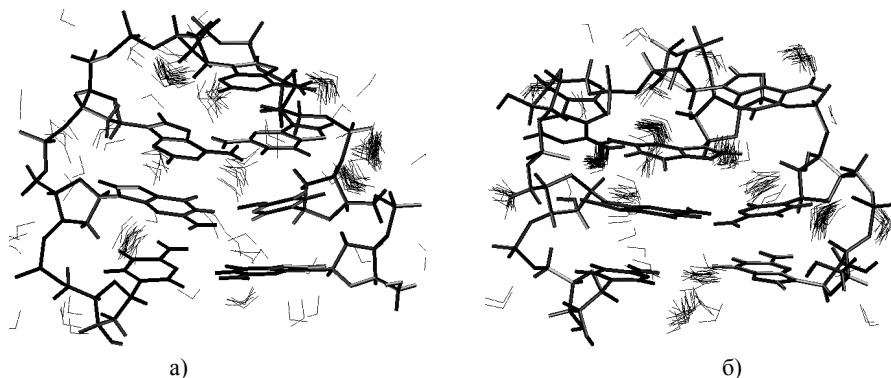


Рисунок 4 – Водные мостики шпилек d(GCGAAGC) (а) и r(GCGAAGC) (б)

которые участвуют в образовании водородных связей. Согласно расчетной структуре, OH-группы всех рибозных колец не участвуют в образовании внутримолекулярных водородных связей, а, напротив, выступают в раствор.

Выводы. Таким образом, проведенное в настоящей работе моделирование динамики теплового движения шпильчатых форм гептануклеотидов d(GCGAAGC) и r(GCGAAGC) подтвердило существенные различия конформаций и подвижности этих олигонуклеотидов и их определяющую роль в стабилизации данных структур. Эти различия обусловлены, по всей видимости, повышенной термодинамической гибкостью дезоксирибонуклеотидного остова по сравнению с рибонуклеотидным, связанной с особенностями конформаций соответствующих сахарных колец.

Библиографический список

1. A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF1010 / D.-M. Miao, Y. Honda, K. Tanaka et al. // *Nucleic Acids Res.* — 1993. — V. 21. — N. 21. — P. 4900–4903.
2. Froelich-Ammon S.J. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II: DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/cleavage / S.J. Froelich-Ammon, K.C. Gale, N. Osheroff // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269. — P. 7719–7725.
3. Most compact hairpin-turn structure exerted by a short DNA fragment, d(GCGAAGC) in solution: an extraordinarily stable structure resistant to nucleases and heat / I. Hirao, G. Kawai, S. Yoshizawa et al. // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — V. 22. — N. 4. — P. 576–582.
4. James J.K. The solution structure of a d[C(TTCG)G] DNA hairpin and comparison to the unusually stable RNA analogue / J.K. James, I.Jr. Tinoco // *Nucleic Acids Res.* — 1993. — V. 21. — N. 14. — P. 3287–3293.
5. Refinement of the d(GCGAAGC) hairpin structure using one- and two-bond residual dipolar coupling / P. Padrta, R. Stefl, L. Kralik et al. // *J. of Biomol. NMR.* — 2002. — V. 24. — N. 1. — P. 1–14.
6. Brunger A.T. X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR / A.T. Brunger. — Yale: Univ. Press, 1992. — 382 p.
7. MacKerell A.D. All-atom empirical force field for nucleic acids. II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution / A.D. MacKerell, N. Banavali // *J. Comp. Chem.* — 2000. — V. 21. — P. 105–120.
8. Verlet L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules / L. Verlet // *Phys. Rev.* — 1967. — V. 159. — N. 1. — P. 98–103.
9. Reddy S.Y. DNA Polymorphism: A Comparison of Force Fields for Nucleic Acids / S.Y. Reddy, F. Leclerc, M. Karplus // *Biophys. J.* — 2003. — V. 84. — P. 1421–1449.

Поступила в редакцию 28.04.2006 г.