

УДК 577.3

## КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ ФРАГМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

**А.В. Шестопалова**

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАНУ, ул.Акад.Проскуры, 12, Харьков, 61085  
e-mail: shestop@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 8 сентября 2006 г.

Методом Монте Карло выполнено моделирование взаимодействия фрагментов нейтральной одноцепочечной и протонированной двухцепочечной спиральных форм полирибоадениловой кислоты (polyrA) с водным окружением. Получены энергетические и структурные характеристики и определены схемы гидратации изученных структурных компонентов polyrA. Проведено сравнение с экспериментальными результатами и показано, что дополнительная стабилизация одно- и двухцепочечных спиральных форм polyrA может осуществляться в результате образования упорядоченной структуры воды в гидратном окружении polyrA.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** метод Монте Карло, полирибоадениловая кислота, протонирование, гидратация

Гомополимеры (олиго- и полинуклеотиды) - удобные модели для изучения различных упорядоченных форм нуклеиновых кислот. В то же время они являются частью природных ДНК и РНК. Например, участки полирибоадениловой кислоты polyrA длиной до 200 нуклеотидов обнаружены в молекулах полидисперсной ядерной РНК и информационных РНК у многих вирусов и в клетках животных [1,2], входят в состав высококонсервативных участков ВИЧ [3]. Богатые цитидином центрамрные и теломерные последовательности ДНК и РНК могут образовывать *in vitro* тетрамерные структуры, которые получили название *i*-мотивов [4,5]. Эти структуры состоят из двух параллельных дуплексов, которые интеркалированы друг в друга во взаимно противоположных направлениях. Каждый из дуплексов содержит полупротонированные пары цитозин-гуанин. В растворе, в отличие от природных нуклеиновых кислот, синтетические гомополимеры могут существовать в виде различных структурных форм в зависимости от внешних условий - pH, температуры, ионной силы, присутствия лиганда и образуют устойчивые одно- и мультицепочечные структуры. Так, полирибоцитидиловая (polyrC) и полирибоадениловая (polyrA) кислоты при нейтральных pH образуют одноцепочечные, а при pH ~ 4 - двухцепочечные спиральные структуры [6]. Стабилизация спиральных гомополинуклеотидов осуществляется за счет дисперсионных, или вертикальных стэкинг-взаимодействий, и в результате образования внутримолекулярных межцепочечных и внутривцепочечных водородных связей. Существенную роль в формировании упорядоченных спиральных структур гомополинуклеотидов играет и водное окружение [7,8]. Методами ИК-спектроскопии, пьезограмметрии и КВЧ-диэлектрметрии [9,10] было проведено исследование структуры и гидратации polyrC в условиях увлажненных пленок и в растворах при разных pH. На основе экспериментальных данных предложены модели гидратного окружения нейтральной и полупротонированной форм polyrC, предполагающие стабилизацию спиральных структур водными мостиками и водными цепочками. Модели подтверждены и уточнены результатами расчетов взаимодействия с водным окружением спиральных олигорибоцитидилов (одноцепочечного тетрапуклеотида и дуплекса полупротонированного тетрапуклеотида), выполненных методом Монте Карло [10,11].

Аналогичные экспериментальные исследования были выполнены для polyrA. Методами ИК-спектроскопии и пьезограмметрии в увлажненных пленках [12,13] и КВЧ-диэлектрметрии в растворах [14] было получено, что степень гидратации одноцепочечной спиральной polyrA составляет 10-12 ( $\pm 1$ ) молекул воды на нуклеотид. Ранее [15] было показано, что гидратация аденозинмонофосфата (АМФ) равна 10-11 молекул воды, из которых 4-5 образуют водородные связи с донорно-акцепторными группами аденина, 1-2 связаны с рибозой и 4 - 5 - с атомами кислорода фосфатной группы [16]. Поэтому можно считать, что гидратация АМФ и polyrA имеет сходный характер и осуществляется на одних и тех же центрах, которыми являются атомы N1, N3, N7 и аминогруппа N6H<sub>2</sub> аденина, а также атомы кислорода сахарофосфатного остова [14]. Степень гидратации двухцепочечной polyrA меньше на 3-4 молекулы, чем у односпирального полинуклеотида, и равна 7-8 молекулам воды на нуклеотид. Это значение намного меньше степени гидратации двуспиральной ДНК, которая составляет 19 - 20 молекул воды на нуклеотид [7]. В отличие от ДНК дополнительного связывания молекул воды, обусловленного формированием двойной спирали, в случае polyrA не наблюдается. Вероятно, малая величина гидратации двухцепочечного спирального комплекса polyrA обусловлена особенностями его структуры. Согласно рентгеноструктурным данным, почти все гидратноактивные центры аденина участвуют в образовании межтяжевых водородных связей. Так, аминогруппа аденина одной цепи связана водородной связью с атомом N7 аденина и с одним

атомом кислорода фосфатной группы противоположной цепи, а связанный с атомом N1 протон может участвовать в образовании водородной связи со вторым атомом кислорода фосфатной группы [6].

Поэтому для более полного описания гидратации одно- и дуспиральной форм *polyrA* в настоящей работе методом Монте Карло выполнено компьютерное моделирование систем, содержащих фрагменты одно- и дуспиральных структур *polyrA* в водных кластерах и проведено сравнение с данными ИК-спектроскопических, пьезограмметрических и диэлектрометрических исследований. Анализ всей совокупности данных позволил предложить молекулярную модель гидратного окружения *polyrA*, стабилизирующего упорядоченные спиральные структуры *polyrA*.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы было изучение гидратации гексануклеотидов нейтрального аденина в одноцепочечной спиральной форме *polyrA* и дуплексов гексануклеотида протонированного аденина в двухцепочечной спиральной форме *polyr(AH-AH)*. Для описания этих процессов на молекулярном уровне необходимо получить энергетические и структурные характеристики систем, содержащих изучаемые соединения и молекулы растворителя. Поэтому нами использовался компьютерный метод Монте Карло, позволяющий получить такие характеристики, а также мгновенные картинки, необходимые при построении моделей гидратного окружения исследуемых молекул. Применение метода Монте Карло для изучения гидратации биомолекул с использованием алгоритма Метрополиса [17] подробно описано в работах [18-20].

Конформация односпиральной *polyrA*, полученная на основе данных рентгеноструктурного анализа, соответствует А-форме РНК со стандартной  $C_3'$ -*эндо* конформацией сахара, содержит 9 нуклеотидов на виток, высота которого равна 25,4 Å, расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 2,82Å, а наклон оснований к оси спирали ~ 24° [21]. Значения семи основных торсионных углов аденозин-монофосфата, являющегося мономером односпиральной *polyrA*, близки к значениям этих углов у А-РНК (Табл.1). Основания находятся в анти-конформации и уложены параллельно друг над другом. Используя эти данные, с помощью программы молекулярного моделирования HyperChemPro7.01 нами была построена пространственная модель гексануклеотида одноцепочечной *polyrA* (рис.1).

Таблица 1. Значения торсионных углов для односпиральной *polyrA* и А-формы РНК [6].

| Системы       | Углы | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | $\delta$ | $\epsilon$ | $\zeta$ | $\chi$ |
|---------------|------|----------|---------|----------|----------|------------|---------|--------|
| <i>polyrA</i> |      | -64      | 154     | 53       | 83       | -145       | -70     | -160   |
| А-РНК         |      | -68      | 178     | 54       | 82       | -153       | -71     | -158   |

Выбор гексануклеотида как фрагмента упорядоченных структур *polyrA* обусловлен тем, что формирование стабильной одно- или двухцепочечной спиральных структур *polyrA*, согласно данным исследования олигомеров полирибоадениловой кислоты с помощью кругового дихроизма, начинается с зародыша порядка 6 пар нуклеотидов [6].

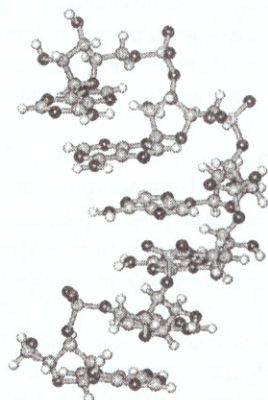


Рис.1. Односпиральная *polyrA*.

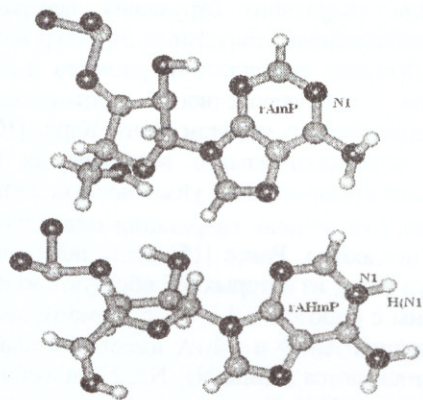


Рис.2. Нейтральный и протонированный *rAmP*

При  $pH \sim 4$  остатки аденина протонируются по положению N1 (рис.2) и образуют водородносвязанную пару (рис.3). Происходит агрегация цепочек с образованием двойной спирали

poly(*r*АН-*r*АН), которая сохраняет структуру двойной спирали в водном растворе и при осаждении на холоде и вытягивании в волокна [22,23].

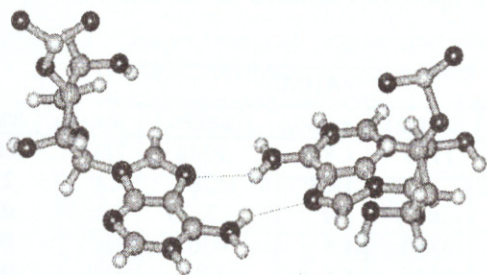


Рис.3. Водородносвязанная пара протонированных *r*АНМФ

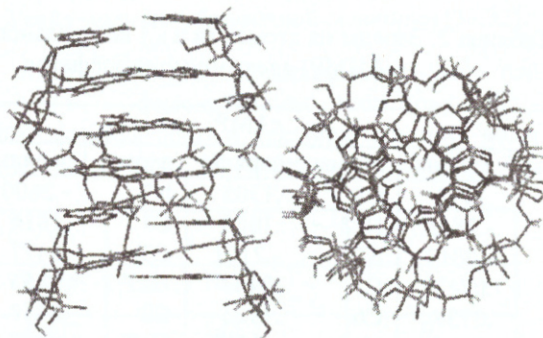


Рис.4. Две проекции двуспиральной протонированной poly(*r*АН-АН).

Rich and oth. [24] по рентгеновской диффракции на волокнах poly*r*A предложили двуспиральную структуру poly(*r*АН-АН), у которой ось симметрии второго порядка совпадает с осью спирали и поэтому имеет место параллельная ориентация цепей. Шаг спирали составляет 30,4Å с 8 парами оснований на виток и расстоянием между ними 3,8Å, углом спирального вращения 45° и углом наклона пары 10°. Но точные данные о пространственной структуре (координаты атомов, торсионные углы) из-за размытости рефлексов на рентгенограмме волокон получить не удалось. Нами с помощью программы молекулярного моделирования HyperChemPro7.1 и последующим уточнением координат атомов методом Монте Карло (оптимизация геометрии двуспиральной poly(*r*АН-АН) была построена модель гексануклеотида двойной спирали с параллельными цепями, принадлежащая к А-семейству (рис.4).

Для решения стоящей перед нами задачи - определения роли воды в стабилизации структурных компонентов poly*r*A - мы изучали фиксированные конформации гексануклеотида poly*r*A и его дуплекса. В действительности, для корректного расчета энергетических характеристик рассматриваемых нами систем необходимо проводить полный конформационный анализ, который требует определения минимума конформационной энергии по многим параметрам. Ранее при изучении взаимодействия poly*r*C с водой методом Монте Карло [10,11] нами было показано, что можно ограничиться моделированием фиксированных конфигураций фрагментов одно- и двуспиральных полинуклеотидов, поскольку сравнение результатов, полученных для водородносвязанной пары нейтрального и протонированного цитозина и динуклеозидмонофосфата цитозина (самых простых структурных компонентов одно- и двуспиральной формы poly*r*C) с фиксированной и изменяющейся геометрией, введение конформационной энергии в расчет энергетических характеристик в рамках нашей задачи не имеет существенного значения.

Поэтому при изучении гидратации двух упорядоченных форм poly*r*A мы ограничились изучением гидратации нейтрального (*r*АМФ) и протонированного (*r*АНМФ) аденозинмонофосфатов, чтобы оценить влияние протонирования на гидратацию, и водородносвязанной пары *r*АНМФ (*r*АНМФ...*r*АНМФ) с фиксированной и изменяющейся геометрией. Конформации нуклеотидов - аденозинмонофосфатов в нейтральной и протонированной форме - соответствуют данным рентгеноструктурного анализа о структуре односпиральной poly*r*A, которая принадлежит к А-семейству со стандартной C<sub>3</sub>-*эндо* конформацией сахара [6]. Конфигурация водородносвязанной пары *r*АНМФ...*r*АНМФ (Рис.3) соответствует конфигурации нуклеозидмонофосфатов противоположных цепей двойной спирали протонированной poly(*r*АН-АН), у которой ось симметрии второго порядка совпадает с осью спирали и поэтому имеет место параллельная ориентация цепей [6]. В случае водородносвязанной пары с изменяющейся геометрией два *r*АНМФ смещались друг относительно друга в рамках алгоритма Метрополиса [17], тогда как конформации сахарофосфатного остова, длины связей и величины валентных углов в процессе расчета не изменялись.

В расчетах исследуемое соединение и 800 молекул воды помещались в центр сферы с жесткими отражательными стенками. Радиус выбирался таким, чтобы объем сферы, необходимый для создания нормальной плотности раствора, был в несколько раз меньше используемого. Радиусы сфер в наших расчетах составляли 25 - 35Å. Расчеты проводились при температуре 298К. Для расчетов энергии межмолекулярных взаимодействий вода-основание и основание-основание использовался модифицированный потенциал Леннарда-Джонса 1-6-12, с параметрами, полученными Полтевым с соавторами [25,26], а для расчетов взаимодействий вода-вода - полуэмпирический потенциал 1-6-*exp*. [27]. Протонирование учитывалось посредством модификации частичных атомных зарядов, которые были получены из *ab initio* расчетов с

базисным набором 3-21G\* с помощью PC версии программы GAMESS PC [28] из программного пакета GAMESS (US) QC [29], для *rAMP* и *rАНМФ* (Таблица 2).

Таблица 2. Заряды на атомах (в а.е.) нейтрального (*rAMP*) и протонированного по положению N1 (*rАНМФ*) аденозинмонофосфатов.

| <i>rAMP</i> |        |       |        |       |        | <i>rАНМФ</i> |        |       |        |                 |        |
|-------------|--------|-------|--------|-------|--------|--------------|--------|-------|--------|-----------------|--------|
| атомы       | заряды | атомы | заряды | атомы | заряды | атомы        | заряды | атомы | заряды | атомы           | заряды |
| Ho5'        | .1911  | C8    | .1305  | N3    | -.2600 | Ho5'         | .1769  | C8    | .1548  | N3              | -.1876 |
| O5'         | -.2845 | Hc8   | .1085  | C4    | .1616  | O5'          | -.2823 | Hc8   | .1281  | C4              | .2115  |
| C5'         | -.0013 | N7    | -.2101 | C3'   | .0477  | C5'          | -.0017 | N7    | -.2229 | C3'             | .0389  |
| Hc5'        | .0743  | C5    | .0447  | Hc3'  | .0855  | Hc5'         | .0780  | C5    | .0303  | Hc3'            | .0689  |
| Hc5'        | .0739  | C6    | .1903  | C2'   | .0458  | Hc5'         | .0646  | C6    | .3495  | C2'             | .0490  |
| C4'         | .0616  | Hc6   | -.3817 | Hc2'  | .0928  | C4'          | .0508  | Hc6   | -.3779 | Hc2'            | .0552' |
| Hc4'        | .0689  | Hn6   | .1977  | Oc2'  | -.3596 | Hc4'         | .0657  | Hn6   | .2863  | Oc2'            | -.3259 |
| O4'         | -.2452 | Hn6   | .1985  | Hoc2' | .2593  | O4'          | -.2592 | Hn6   | .2610  | Hoc2            | .2305  |
| C1'         | .1698  | N1    | -.2206 | Oc3'  | -.3703 | C1'          | .1685  | N1    | -.2953 | Oc3'            | -.4193 |
| Hc1'        | .0685  | C2    | .1202  | P     | .8711  | Hc1'         | .0959  | C2    | .1935  | P               | .7009  |
| N9          | -.2837 | Hc2   | .0928  | Op1   | -.2458 | N9           | -.2360 | Hc2   | .1416  | Op1             | -.6269 |
|             |        |       |        | Op2   | -.2636 |              |        |       |        | Op2             | -.3164 |
|             |        |       |        |       |        |              |        |       |        | H <sub>N1</sub> | .2740  |

Нуклеозидмонофосфаты в растворе при физиологических условиях заряжены отрицательно из-за полной ионизации фосфатных групп. Нейтрализация заряда на фосфатных группах осуществляется за счет противоионов, находящихся в растворе. Как правило, это ионы Na<sup>+</sup>. В наших расчетах ионы в явном виде не учитывались, но заряды на фосфатных группах были рассчитаны так, чтобы сохранить условия электронейтральности. Такое приближение широко используется при конформационном анализе нуклеиновых кислот и их фрагментов [26] и при изучении гидратации ди- и олигонуклеотидов методом Монте Карло [20,30].

Для установления равновесного состояния каждой системы длина генерируемой марковской цепи составляла  $4 \times 10^6$  элементарных конфигураций. Статистическая ошибка при вычислении термодинамических величин в наших расчетах (полной потенциальной энергии систем) была порядка  $\pm 0.005 - 0.007$  ккал/моль. Чтобы достичь такой точности вычислений, длины генерируемых марковских цепей составляли  $20 \times 10^6$  элементарных конфигураций для систем с фиксированной геометрией и  $25 \times 10^6$  для систем с изменяющейся геометрией.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Системы *rAMФ*, *rАНМФ*, *rАНМФ...rАНМФ* + H<sub>2</sub>O

Первый этап исследования гидратации двух спиральных форм polyrA – это моделирование систем, содержащих *rAMФ*, *rАНМФ* и *rАНМФ...rАНМФ* в кластере из 800 молекул воды. Основная задача на этом этапе исследования – получение энергетических и структурных характеристик перечисленных выше систем, которые позволят определить влияние протонирования на гидратацию компонентов polyrA и сравнить полученные результаты с известными экспериментальными данными о гидратации *rAMФ*.

Энергетические характеристики исследованных систем представлены в таблице 3. Здесь  $U_{TOT}$  и  $U_{WW}$  – средние значения полной энергии систем и энергий взаимодействия вода-вода,  $U_{WB}$  – средняя энергия взаимодействия вода - растворенное вещество,  $N_{H_{2O}_{HCB}}$  – число молекул воды, образующих водородные связи с исследуемым веществом. Также приведены значения средних энергий взаимодействия *rАНМФ...rАНМФ*  $U_{BB}$  для водородносвязанных пар.

Как видно из результатов Таблицы 3, все системы энергетически стабильны. Энергетическая стабильность нейтрального и протонированного *rAMФ* определяется их взаимодействием с водой (значения энергий взаимодействия *rAMФ* или *rАНМФ* – вода,  $U_{WB}$ ) при практически одинаковом влиянии обеих форм *rAMФ* на структуру растворителя (значения энергий взаимодействия вода-вода,  $U_{WW}$ ). Число молекул воды, формирующих первую гидратную оболочку в результате образования водородных связей с донорно-акцепторными группами исследуемого соединения, можно определить из анализа мгновенных конфигураций на стационарном участке моделирования. При таком анализе мы используем геометрические и энергетические критерии водородной связи. Водородные связи

## Компьютерное моделирование гидратации...

образуются, если расстояние между атомом водорода и акцептором водородной связи не более  $2,7\text{\AA}$  (или расстояния между электроотрицательными атомами не более  $3,2\text{\AA}$ , угол между акцептором водородной связи, атомом водорода и донором водородной связи больше  $120^\circ$ ; энергия взаимодействия между молекулами воды (1 водородная связь) более 2,5 - 3 ккал/моль (по абсолютной величине) [31,32].

Таблица 3. Энергетические характеристики систем *r*АМФ, *r*АНМФ, водородносвязанных пар *r*АМФ...*r*АНМФ с различной геометрией (а. - фиксированная геометрия, б. - изменяющаяся геометрия) в кластере из 800 молекул воды и кластера «чистой» воды (данные приведены в ккал/моль: \* - на одну молекулу воды, \*\* - в целом на систему).

| Система              | * $U_{\text{ТОТ}}$ | ** $U_{\text{ТОТ}}$ | * $U_{\text{WВ}}$ | ** $U_{\text{WВ}}$ | $\text{H}_2\text{O}_{\text{Нсв}}$ |
|----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|
| <i>r</i> АМФ         | -8.538±0.005       | -6830.4             | -8.408            | -103.0             | 8                                 |
| <i>r</i> АНМФ        | -8.599±0.005       | -6879.2             | -8.407            | -144.7             | 9                                 |
| <i>r</i> АНМФ ... а. | -8.659 ±0.005      | -6927.2             | -8.343            | -117.4 + -127.3    | 14: 7 + 7                         |
| <i>r</i> АНМФ б.     | -8.678 ±0.007      | -6942.4             | -8.373            | -115.7 + -121.7    | 15: 7 + 8                         |
| $\text{H}_2\text{O}$ | -8.490±0.005       | -6792.0             | -8.490            |                    |                                   |

$U_{\text{ВВ}}$ : НВ-пара: а. = -7.847 ккал/моль; б. = -7.004 ккал/моль.

Нейтральный *r*АМФ связывает  $8 \pm 1$  молекул воды, а протонированный -  $9 \pm 1$  молекул воды. На Рис.5а и Рис.6а показаны мгновенные конфигурации части водного кластера с нейтральной *r*АМФ и протонированной *r*АНМФ формами, а на Рис. 5б, Рис.6б приведены схемы моногидратации *r*АМФ и *r*АНМФ, соответственно. Для каждой из 8 молекул воды, входящих в первую гидратную оболочку *r*АМФ, приведены расстояния (в  $\text{\AA}$ ) и углы (в градусах), соответствующие геометрическим критериям водородной связи. Энергии взаимодействия *r*АМФ-вода  $U_{\text{WВ}}$  для этих молекул воды изменяется в пределах от  $\sim -4.6$  ккал/моль до  $\sim -9.8$  ккал/моль для молекулы воды, занимающей мостиковое положение между атомом N7 и группой N6H<sub>2</sub>. Все схемы моногидратации для исследованных в работе систем выполнены аналогично.

Отличие от экспериментальных оценок гидратации *r*АМФ (10-11 молекул воды, [15]) определяется тем, что по данным компьютерного моделирования с фосфатными группами связаны 3 молекулы воды, а не 4, как было определено из экспериментальных результатов.

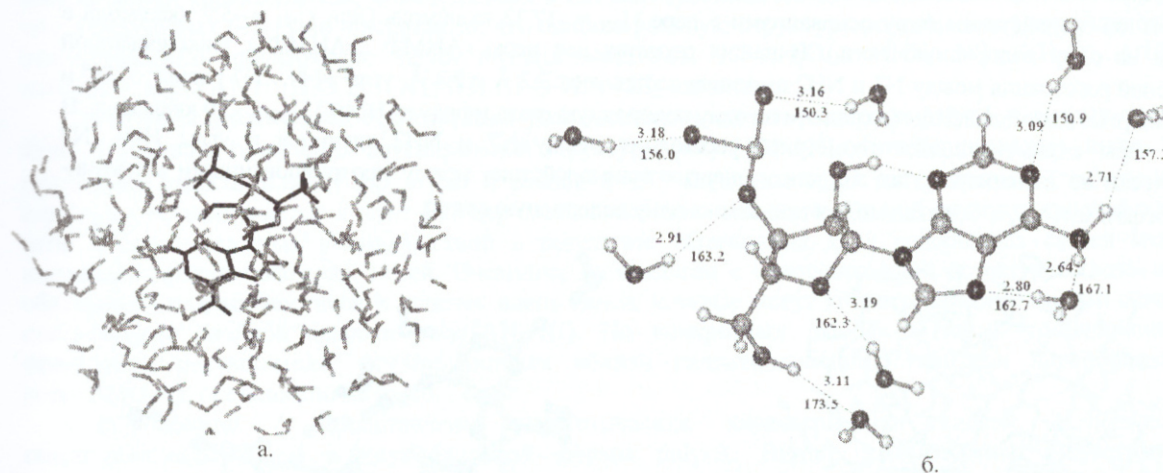


Рис.5. Мгновенные конфигурации *r*АМФ + 800 молекул воды. а. *r*АМФ+ 227 молекул воды в сфере радиуса 11  $\text{\AA}$ ; б. *r*АМФ и 8 молекул воды, образующих водородные связи с донорно-акцепторными группами *r*АМФ. Водородные связи показаны пунктиром.

Такое различие может быть вызвано тем, что в моделировании мы не учитываем в явном виде ион  $\text{Na}^+$ . Гидратация основания - аденина у нейтральной формы *r*АМФ также несколько ниже по сравнению с экспериментальными данными, так как у нейтральной формы *r*АМФ возможно образование внутримолекулярной водородной связи N3... H'O'2C2' (Рис.5б). Поэтому атом N3 не может образовать водородную связь с молекулой воды.

У протонированного *r*АНМФ схема моногидратации практически не отличается от *r*АМФ, но разрыв внутримолекулярной водородной связи N3...H'O'2C2' приводит к образованию водородной

связи атома N3 аденина с 1 молекулой воды (Рис. 6б). Гидратация групп сахарного кольца не отличается от экспериментальных результатов и составляет 1-2 молекулы воды, но гидратация фосфатной группы несколько меньше, как и в случае гидратации нейтральной формы *r*АМФ. Таким образом, протонирование *r*АМФ по положению N1 практически не изменило гидратацию сахарофосфатных групп *r*АМФ, но разрыв внутримолекулярной водородной связи привел к увеличению гидратации аденина на 1 молекулу воды за счет образования водородной связи N3...H<sub>2</sub>O.

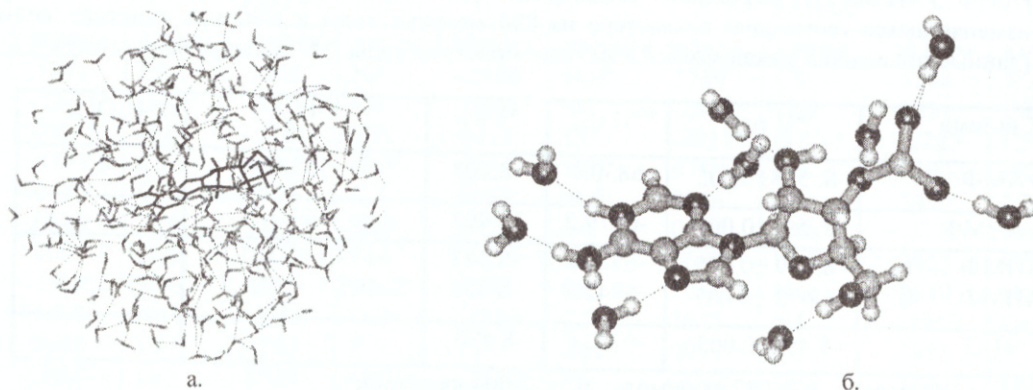


Рис.6. Мгновенные конфигурации *r*АМФ. а. *r*АМФ+ 317 молекул воды в сфере радиуса 12 Å; б. *r*АМФ и 9 молекул воды, образующих водородные связи с донорно-акцепторными группами *r*АМФ. Водородные связи показаны пунктиром.

Рассмотрим энергетические и структурные характеристики двух состояний пары *r*АМФ...*r*АМФ – с фиксированной и изменяющейся геометрией. Как видно из результатов, представленных в Таблице 3, эти два состояния пары *r*АМФ...*r*АМФ энергетически отличаются менее чем на 1%. Как показывает анализ мгновенных конфигураций и величины энергии взаимодействия *r*АМФ – *r*АМФ  $U_{\text{ВВ}}$ , обе водородные связи сохраняются и у фиксированной, и у изменяющейся конформации пары (Рис.7,8). Эти связи соответствуют критериям водородной связи, характерные для образования таких пар азотистых оснований нуклеиновых кислот. Так, в работе по моделированию методом Монте Карло гидратации водородносвязанной пары G...C [33] получено, что в кластере из 345 молекул воды пара G...C образует три водородные связи с расстояниями между атомами донорно-акцепторных групп гуанина и цитозина от 2.96Å (водородная связь Гуанин-N1H...N3-Цитозин) до 3.04 Å (водородная связь Гуанин-NH<sub>2</sub>...O=C-Цитозин) и энергией взаимодействия между основаниями в паре  $U_{\text{ВВ}} = -17,32$  ккал/моль (или  $U_{\text{ВВ}} \approx -5.7$  ккал/моль в среднем на одну водородную связь). В наших расчетах для пары *r*АМФ...*r*АМФ с фиксированной геометрией расстояния между N7 и NH<sub>2</sub> аденинов составляют 3.2 Å и 2.8 Å, углы H-N...N7 равны ~ 178° и 167°, а энергия взаимодействия (в среднем на одну водородную связь между *r*АМФ)  $U_{\text{ВВ}} \approx -3.0$  ккал/моль. В случае пары с изменяющейся геометрией расстояния между N7 и NH<sub>2</sub> аденинов и углы H-N...N7 практически не изменились, так же, как и энергия взаимодействия между протонированными аденозин-монофосфатами ( $U_{\text{ВВ}} \approx -3.9$  ккал/моль в среднем на одну водородную связь).

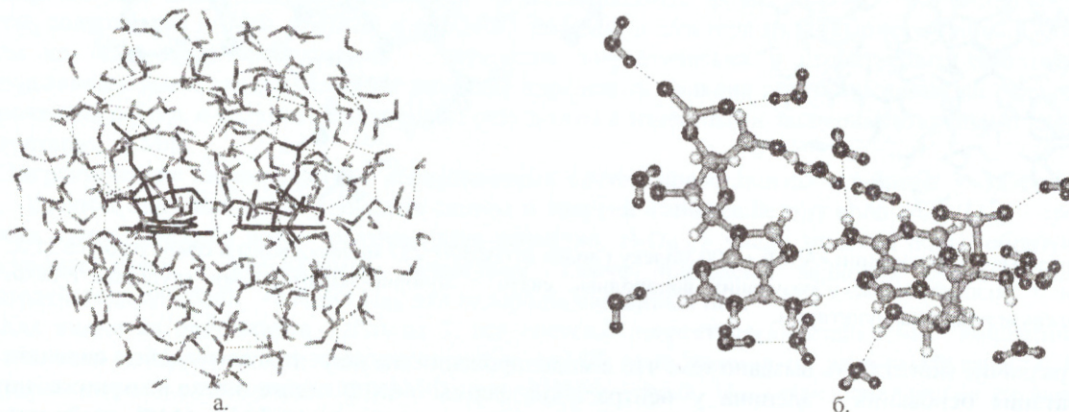


Рис.7. Мгновенные конфигурации пары *r*АМФ...*r*АМФ с изменяющейся геометрией. а. *r*АМФ...*r*АМФ + 215 молекул воды в сфере радиуса 12 Å; б. *r*АМФ...*r*АМФ и 14 молекул воды, образующих водородные связи с донорно-акцепторными группами *r*АМФ...*r*АМФ. Водородные связи показаны пунктиром.

В результате образования двух межмолекулярных водородных связей N7...HNN гидратация каждого из *r*АНМФ в обеих парах уменьшается, поскольку гидратноактивные центры N7 и NH2 дегидратируются. Гидратация *r*АНМФ...*r*АНМФ пары в обоих состояниях, или число связанных с парой молекул воды  $H_2O_{HCB}$ , практически не отличается. Аденины и фосфатные группы обоих *r*АНМФ связывают по 3 молекулы воды, а рибозы по 1-2 молекулы воды в каждой из моделированных систем. Таким образом, гидратация водородносвязанной пары составляет 7-8 молекул воды на нуклеотид.

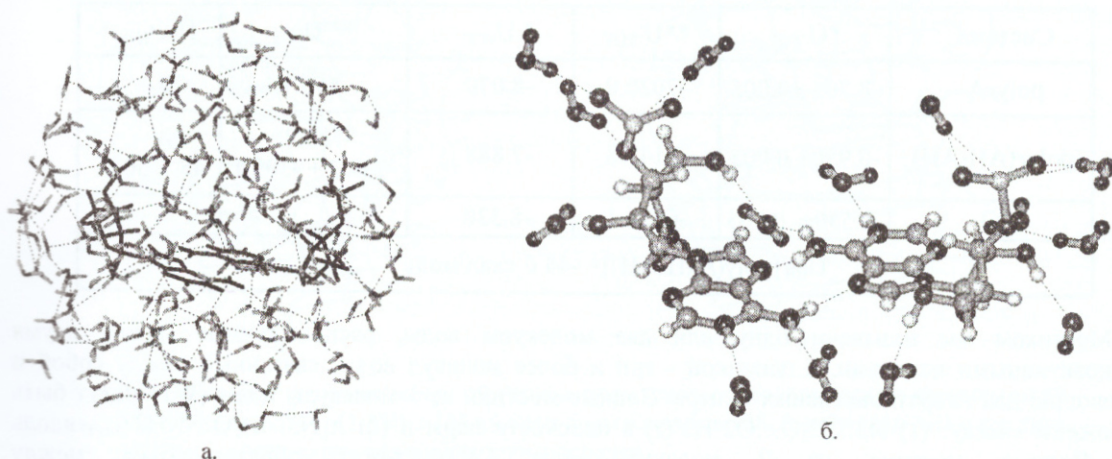


Рис.8. Мгновенные конфигурации *r*АНМФ...*r*АНМФ с фиксированной геометрией. а. *r*АНМФ...*r*АНМФ + 218 молекул воды в сфере радиуса 12 Å; б. *r*АНМФ...*r*АНМФ и 15 молекул воды, образующих водородные связи с донорно-акцепторными группами *r*АНМФ...*r*АНМФ. Водородные связи показаны пунктиром.

#### Системы polyrA + H<sub>2</sub>O и polyr(АН-АН) + H<sub>2</sub>O

Рассмотрим гидратацию двух различных спиральных структур polyrA. Согласно экспериментальным данным, односпиральная конформация polyrA формируется при ~80% относительной влажности, или связывании  $10 - 11 \pm 1$  молекулы воды на нуклеотид. Стабилизация такой структуры обеспечивается Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между плоскостями аденинов вдоль цепи (стэкинг-взаимодействия) и, возможно, молекулами воды. По изменению спектральных характеристик, определенных в ИК-спектроскопических исследованиях пленок polyrA при нейтральных pH, было предложено, что односпиральную структуру polyrA может дополнительно стабилизировать образование таких водных мостиков: N7...H<sub>2</sub>O... HNN, N7...2(H<sub>2</sub>O)...O1P в плоскости пары и N1...H-O-H... N1, N3...H-O-H... NH<sub>2</sub> вдоль цепи.

По данным аналогичных исследований увлажненных пленок и растворов polyrA в кислых средах, была определена гидратация двуспиральной структуры polyr(АН-АН), которая оказалась ниже, чем гидратация односпиральной структуры и равной  $8 \pm 1$  молекулы воды на нуклеотид. Стабилизация структуры осуществляется за счет Ван-дер-ваальсовых стэкинг-взаимодействий остатков аденина вдоль цепи и межцепочечных взаимодействий в результате образования двух водородных связей между аденинами противоположных цепей. Очевидно, по аналогии с односпиральной структурой, возможны образования водных мостиков и цепочек вдоль цепей, которые могут вносить дополнительный вклад в стабилизацию двойной спирали polyr(АН-АН). Но конкретных данных о таких упорядоченных фрагментах растворителя, формирующихся вблизи гидратно-активных центров двуспиральной polyr(АН-АН), предложено не было.

В таблице 4 представлены энергетические характеристики систем, содержащих гексануклеотиды одно- и двуспиральной формы polyrA. Видно, что системы энергетически стабильны. С односпиральным гексануклеотидом связаны порядка 70 молекул воды, или 11-12 молекул воды на нуклеотид, что согласуется с экспериментальными данными [12,14]. Рассмотрим мгновенные конфигурации этой системы (Рис.9).

Анализ мгновенных конфигураций позволяет сделать вывод, что в спиральных фрагментах polyrA сохраняются центры гидратации, определенные для изолированных структурных компонентов. При образовании спиральных олигонуклеотидов polyrA молекулы воды, связывающиеся с отдельными гидратно-активными группами нуклеотидов, формируют упорядоченные водные структуры, занимая мостиковые положения между донорно-акцепторными группами фрагментов polyrA.

Можно выделить 48 молекул воды, которые образуют систему водных мостиков и цепочек между донорно-акцепторными группами гексануклеотида. Детальный анализ позволяет выделить три

типа упорядоченных структур воды вблизи односпиральной *polyrA*. Это водные мостики (Рис.9, тип молекул воды W1 и W2) и водные цепочки (Рис.9, тип молекул воды W3).

Таблица 4. Энергетические характеристики систем *polyrA* и *polyr(АН-АН)* в кластере из 800 молекул воды и кластера «чистой» воды (данные приведены в ккал/моль: \* - на одну молекулу воды, \*\* - в целом на систему).

| Система                                   | *U <sub>ТОТ</sub> | **U <sub>ТОТ</sub> | *U <sub>ВВ</sub> | **U <sub>ВВ</sub>          | H <sub>2</sub> O <sub>Нсв</sub> |
|---|-------------------|--------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>polyrA</i>                             | -8.765 ± 0.005    | -7020.0            | -8.070           | -556.1                     | 70                              |
| <i>polyr(АН-АН)</i>                       | -8.930 ± 0.005    | -7143.8            | -7.888           | -788.8:<br>-389.7 + -399.1 | 98:<br>48 + 50                  |
| H <sub>2</sub> O                          | -8.530 ± 0.005    | -6824.1            | -8.530           |                            |                                 |
| $U_{ВВ} [poly(rАН-АН)] = -44.6$ ккал/моль |                   |                    |                  |                            |                                 |

Мостиком мы называем одну или две молекулы воды, расположенные между двумя гидратноактивными центрами, а цепочкой - три и более молекул воды, связанные между собой и соединяющие два гидратноактивных центра. Водные мостики из 1 молекулы воды (W1) могут быть расположены между: (1) N3...H<sub>2</sub>O...O2'H2'(r) в плоскости пары и (2) A<sub>n</sub>N3...H<sub>2</sub>O...NH2A<sub>n+1</sub> вдоль цепи. Водные мостики из 2 молекул воды (W2) могут образовываться между (A)N3...2H<sub>2</sub>O...O2'H2'(r). Водные цепочки из 3 и более молекул воды (W3) могут образовываться между группами сахарофосфатного остова OPO..nH<sub>2</sub>O...O4'(r)...H<sub>2</sub>O...O2'C2'(r). Эти водные мостики и цепочки соединяют донорно-акцепторные группы *polyrA* вдоль цепи. Определенные из анализа мгновенных конфигураций водные мостики и цепочки согласуются с возможными мостиковыми положениями молекул воды, предложенными на основе экспериментальных данных.

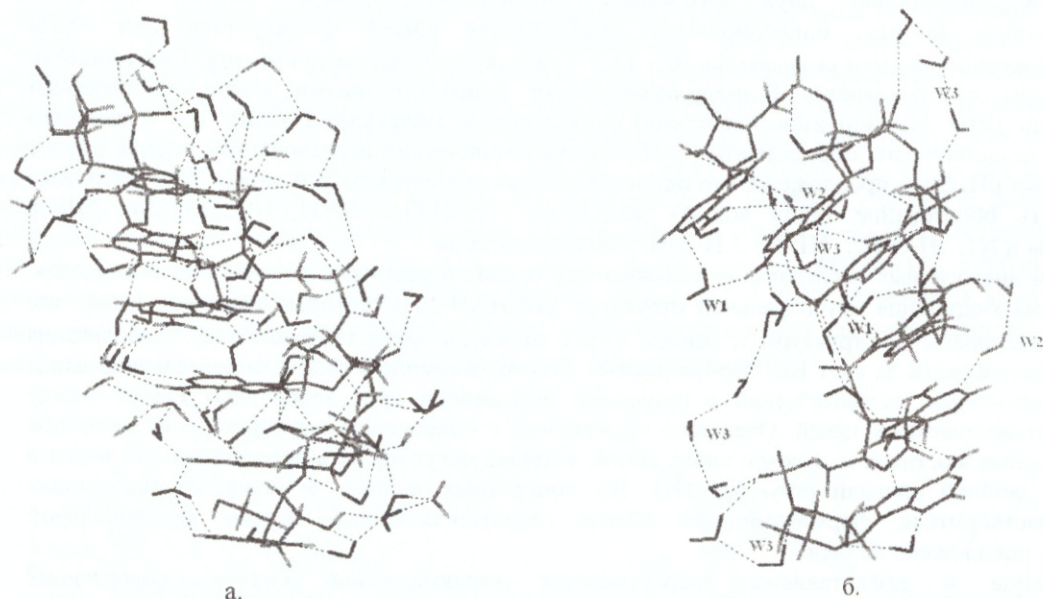


Рис.9. Фрагменты упорядоченной структуры воды около гексануклеотида односпиральной *polyrA*. а. *polyrA* и 70 молекул воды. Выделены 48 молекул воды, образующие сетку водородных связей между группами *polyrA*; б. *polyrA* и три типа молекул воды, образующих водные мостики и цепочки.

Рассмотрим результаты моделирования гексануклеотида двуспиральной структуры протонированной *polyr(АН-АН)* (Табл. 4). Стабильность этой системы определяется как взаимодействием между цепями в двойной спирали, которая составляет около -7 ккал/моль на пару оснований (-44.6 ккал/моль для дуплекса), так и взаимодействием с растворителем.

Наибольший вклад во взаимодействие *polyr(АН-АН)* с водой вносят 98 молекул воды, с каждой из цепей водородные связи образуют приблизительно одинаковое число молекул воды ~ 48 ± 1 молекулы воды или 8 ± 1 молекула воды на нуклеотид. Эти результаты также согласуются с экспериментальными данными о гидратации двуспиральной *polyr(АН-АН)* [13,14]. Анализ мгновенных



конфигураций гексануклеотида двухцепочечной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  в водном кластере (Рис.10а) позволил обнаружить три типа упорядоченных фрагментов молекул воды, которые могут вносить дополнительный вклад в стабилизацию двойной спирали  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$ .

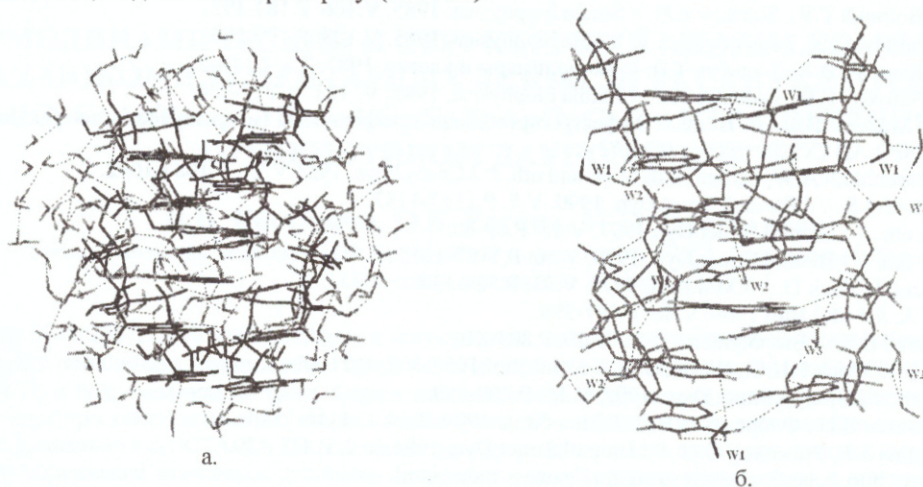


Рис.10. Фрагменты упорядоченной структуры воды около гексануклеотида двуспиральной  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$ . а.  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  и 190 молекул воды в радиусе 12Å; б.  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$  и три типа молекул воды, образующих водные мостики и цепочки.

Это водные мостики, тип молекул воды W1 и W2, и водные цепочки, тип молекул воды W3 (Рис.10б). Водные мостики из 1 молекулы воды (W1) могут быть расположены между: (A)N3...H<sub>2</sub>O...O2'H2'(r); (A)N1H...H<sub>2</sub>O...O5'C5'(остов); NH2...H<sub>2</sub>O...OP (атом О фосфатной группы). Эти мостики соединяют указанные донорно-акцепторные группы  $\text{polyrA}$  вдоль каждой из цепей. Водные мостики из 2 молекул воды (W2) могут образовываться между: (остов) O3'...2 H<sub>2</sub>O...O4'(r); (A) N3...2H<sub>2</sub>O...O4'(r); C2'O2'H...2H<sub>2</sub>O...O4'(r); (A)N3...2H<sub>2</sub>O...H2'O2'(r). Эти мостики соединяют указанные донорно-акцепторные группы  $\text{polyrA}$  вдоль каждой из цепей. Водные цепочки из 3 молекул воды (W3) могут образовываться между: (A1)N1H...2H<sub>2</sub>O...(A2)N3...H<sub>2</sub>O...O2'C2'(r); (A)N3...2H<sub>2</sub>O...O4'(r)...H<sub>2</sub>O...O2'C2'(r).

Помимо водных мостиков возможна дополнительная стабилизация упорядоченной структуры  $\text{polyr}(\text{АН-АН})$ , которую вносит водородная связь между N1H...OP группами одного аденозинмонофосфата (Рис.10б).

## ВЫВОДЫ

Компьютерное моделирование методом Монте Карло систем, содержащих компоненты нейтральной и протонированной форм полирибоадениловой кислоты в водных кластерах, позволило определить роль водного окружения в стабилизации одно- и двуспиральных структур  $\text{polyrA}$ . Показано, что протонирование аденина по положению N1 практически не повлияло на гидратацию аденозинмонофосфата. Полученные при моделировании данные о количестве и распределении связанных с  $r\text{AMФ}$  молекул воды согласуются с экспериментальными данными. На основе анализа мгновенных конфигураций фрагментов одно- и двухцепочечных фрагментов спиральных форм  $\text{polyrA}$  в водных кластерах определены молекулы воды, формирующие упорядоченные структуры в гидратном окружении гексануклеотида  $\text{polyrA}$  и его протонированного дуплекса. При образовании спиральных олигонуклеотидов  $\text{polyrA}$  молекулы воды, связывающиеся с отдельными гидратно-активными группами нуклеотидов, формируют упорядоченные водные структуры, занимая мостиковые положения между донорно-акцепторными группами фрагментов  $\text{polyrA}$ . Образование таких водных мостиков и цепочек может дополнительно стабилизировать одно- и двухцепочечные спирали нейтральной и протонированной форм полирибоадениловой кислоты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edmonds M., Winters M.A. // Prog.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. 1976. V.17. P.149-179.
2. Ahlquist P., Kaesberg P. // Nucl.Acids Res. 1978. V.7. P.1195-1204.
3. Gee A. H., Kasprzak W., Shapiro B. A. // J.Biomol.Str.Dyn. 2006. V.23. P. 417-428.
4. Gueron M., Leroy J-L. The i-motif in nucleic acids // Cur.Opin.Struct.Biol. 2000. V. 10. P.326-331.
5. Snoussi K., Nonin-Lecomte S., Leroy J.-L. The RNA i-motif. // J.Mol.Biol. 2001. V. 309. P.139-153.
6. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: -М.: Мир, 1987.-584с.
7. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // Биофизика. 1993. Т.38. С.768-790 .
8. Semenov M.A., Bereznyak E.G. // J.Comments on Mol.Cell.Biophys. 2000. V.1. P.1-23, 2000

9. Семенов М.А., Большух Т.В., Сагайдакова Н.Н., Малеев В.Я. // *Биофизика*. 2000. Т.45. С.34-39.
10. Maleev V., Semenov M., Kashpur V. and oth. // *J. Mol.Structure*. 2002, V. 605. P.51-61.
11. Анищенко Д.Б., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. // *Вісник ХДУ № 488. Біофізичний вісник*. 2000. вип.6. С. 26-32.
12. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Starikov E.B. // *Studia biophysica*. 1985. V.106. P.181-192.
13. Bolbukh T.V., Starikov E.B., Semenov M.A. // *Studia biophysica*. 1985. V.108. P.199-207.
14. Семенов М.А., Кашпур В.А., Большух Т.В. // *Биополимеры и клетка*. 1987. Т.3. С. 18-22.
15. Semenov M.A., Starikov E.B., Bolbukh T.V. // *Studia biophysica*. 1985. V. 123. P. 217-224.
16. Кашпур В.А., Малеев В.Я. // В кн. "Эффекты нетеплового воздействия мм излучения на биологические объекты". М., ИРЭ АН СССР, 1983, с.163-172
17. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N. and oth. // *J.Chem.Phys*. 1953.V.21. P.1087-1092.
18. Danilov V.I., Tolokh I.S. // *J.Biomol.Struct.Dyn*. 1990. V.7. P.1167-1183.
19. Danilov V.I. and oth. // *J.Biomol.Struct.Dyn*.1997. V.15. P.69-80.
20. Danilov V.I. and oth. // *J.Biomol.Struct.Dyn*. 1999. V.16. P.1107-1117.
21. Saenger W., Riecke J., Suck D. // *J.Mol.Biol*. 1975. V.93. P.529-534.
22. Finch J.T., Klug A. // *J.Mol.Biol*.1969. V.46. P.597-598 .
23. Lerner D.B., Kearns D.R. // *Biopolymers*. 1981. V.20. P.803-816 .
24. Rich A., Davies D.R. Crick F.H.C., Watson J.D. // *J.Mol.Biol*.1961. V.3. P.71-86.
25. Poltev V.I. and oth. // *J.Biomol.Struct.Dyn.*, 1998, V.16. P.289-300.
26. Журкин В.Б., Полтев В.И., Флорентьев В.Л. // *Мол.биол*. 1980. Т.14. С.1116-1130.
27. Poltev V.I., Groklina T.I., Malenkov G.G. // *J.Biomol.Struct.Dyn*. 1984. V.2. P.413-429.
28. Granonovsky A.A., <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>
29. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al // *J. Comput. Chem*. 1993. V. 14. P. 1347-1363
30. Subramanian P.S., Beveridge D.L. // *J.Biomol.Struct.Dyn*. 1989. V.6. P.1093-1122.
31. Malenkov G.G., Tytik D.L., Zheligovskaya E.A. // *J.Mol.Liquids*. 1999. V.82. P. 27-38.
32. Arai S., Chatake T., Ohhara T. and oth. // *Nuc.Acids Res*.2005. V.33. P.3017-3024.
33. Coutinho K., Ludwig V., Canuto S. // *Phys.Rev. E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids and Related Interdisciplinary Topics*. 2004. V. 69. P. 61902-61908.