

УДК 577.32

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЛАКСАЦИИ СТРУКТУРНОЙ ДЕФОРМАЦИИ ДНК ТИПА “КИНК”

Я.В. Шашель, М.Е. Толсторуков

*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков 61077, Украина
e-mail: tolstorukov@gmail.com*

Поступила в редакцию 4 октября 2006 г.

Для изучения механизма релаксации изгибной деформации ДНК типа кинк (излом) было проведено моделирование молекулярной динамики и сравнительный анализ структуры ДНК из комплекса с пуриновым репрессором и структуры свободной В-ДНК. В работе рассматривалась временная эволюция как параметров, описывающих структуру ДНК на уровне динуклеотидного контакта, так и параметров описывающих структуру дуплекса ДНК в целом. Показано, что релаксация кинка димерного контакта происходит скачкообразно на начальных стадиях динамики. В тоже время, такая релаксация кинка сопровождается перераспределением изгиба между несколькими соседними контактами и дуплекс в целом остается изогнутым. Полная релаксация дуплекса происходит плавно и занимает значительно больший временной интервал. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии разных уровней структурной релаксации дуплекса ДНК, которые характеризуются различными временными шкалами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, структурные деформации, кинк, механизмы релаксации, молекулярная динамика, время релаксации.

Конформационная подвижность макромолекул играет важную роль для процессов белково-нуклеинового взаимодействия [1-3]. При этом, как правило, деформабильность нуклеиновых кислот (способность макромолекулы принимать ту или иную конфигурацию), а не белка, определяет стереохимическое соответствие между макромолекулами в комплексе. Деформабильность ДНК является сиквенс-специфичной, так как энергия, требуемая для возникновения деформации, отличается для разных последовательностей, что и представляет основной молекулярный механизм непрямого узнавания последовательности в белково-нуклеиновых комплексах.

Так, одним из наиболее ярких примеров непрямого узнавания является возникновение изгибных деформаций ДНК в комплексах. Некоторые ДНК-связывающие белки приводят к значительным изгибным деформациям, в особенности при взаимодействии с малым желобком (PurR [4], TBP [5], LEF-1 [6] и т.д.). В этих комплексах взаимодействия в малом желобке, как правило, локализованы на одном или нескольких динуклеотидных контактах и приводят к сильному изгибанию ДНК (в сравнении с канонической геометрией В-ДНК) в сторону большого желобка так называемым кинкам [7, 8]. Необходимо отметить, что образование кинков часто сопровождается интеркаляцией аминокислотных остатков между основаниями.

Механизмы кинкования ДНК, включая сиквенс-специфичность, интенсивно изучались в последнее время [9-11]. Было показано, что деформированная структура ДНК стабилизируется за счет перестроек в геометрии сахаро-фосфатного остова, таких как переключения упаковки сахаров и изменения равновесного значения двугранного угла, определяющего положения основания относительно гликозидной связи [12-15]. В целом, возникновение кинков сопровождается увеличением ширины малого желобка и экспонированием оснований в этот желобок. Кроме того, присутствие кинка в малом желобке изменяет взаимное расположение нуклеотидов, находящихся с разных сторон кинка (уменьшает расстояние между ними со стороны большого желобка), что необходимо для пространственного совмещения взаимодействующих поверхностей белка и ДНК в ряде комплексов [16].

Однако механизмы релаксации изгибных деформаций, вызванных кинками, изучены слабо. В то же время, такие механизмы важны в контексте изучения путей выбора нативной последовательности при взаимодействии белка с геномной ДНК. В нашей работе мы исследовали молекулярные пути релаксации изгибной деформаций ДНК, вызванной кинкованием, на примере ДНК из комплекса с пуриновым репрессором [4]. Полученные результаты предоставляют информацию о механизмах релаксации малого желобка ДНК и позволяют сделать вывод о наличии разных уровней такой перестройки структуры дуплекса ДНК, которые имеют различные характерные времена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были проанализированы две последовательности ДНК d(GCAAGCGCTTGC). В первом моделировании начальная конфигурация ДНК была взята из кристаллической структуры комплекса пуринового репрессора (в данной работе обозначена как PurR-DNA) [17]. Во втором моделировании начальная конфигурация ДНК была создана с использованием средних динуклеотидных параметров, полученных для каждого димера из анализа кристаллических структур В-ДНК (обозначается как B-DNA) [2].

Молекулярно-динамическое моделирование выполнялось с использованием пакета программ NAMD [18] с силовым полем CHARMM [19]. В каждом моделировании полиионный заряд ДНК был нейтрализован путем добавления противоионов Na^+ в позиции, характеризуемые наибольшей напряженностью электростатического поля. Затем каждая из систем была сольватирована (использовалась модель молекул воды TIP3P) в прямоугольной ячейке. Размеры ячейки были заданы такими, что молекула ДНК отстояла от границ не менее чем на 12 Å в каждом направлении. Дополнительно для моделирования физиологической ионной силы раствора были добавлены ионы Na^+ и Cl^- до концентрации, соответствующей 0,15 M NaCl.

Для оптимизации положения атомов водорода и молекул растворителя была проведена первоначальная релаксация системы с фиксацией тяжелых атомов ДНК (1000 шагов). В дальнейшем минимизация (метод сопряженных градиентов) и нагрев системы до 300 K были выполнены в течение 300 пс с приложением дополнительного гармонического потенциала к тяжелым атомам для их частичной фиксации. Система была уравновешена в течение 200 пс с постепенным уменьшением степени фиксации атомов ДНК. Отметим, что в нашем случае не проводилось длительного уравновешивания системы без наложения ограничений, которое зачастую используется в молекулярной динамике нуклеиновых кислот. Вместо этого проводился дополнительный этап уравновешивания молекул воды и ионов при полностью фиксированных атомах ДНК. Такой протокол связан со спецификой поставленной задачи, а именно, задачей проанализировать динамику деформированной ДНК на начальном этапе. Затем было выполнено моделирование системы в NPT режиме в течение 10 нс. Однако, как показывают наши данные (см. раздел Результаты), полная релаксация деформации структуры ДНК проходит за более короткий промежуток времени, и поэтому, на графиках приведены данные для первых 2 нс.

Для моделирования всех связей атомов водорода использовался алгоритм SHAKE, что сделало возможным временной шаг в 2 фс. Дальние электростатические взаимодействия моделировались с использованием суммирования Эвальда (PME) [20]. Постоянное давление поддерживалось используя Ланжевиевскую динамику (Langevin piston method) [21] с периодом 100 фс и температурой 300 K.

Структурные параметры рассчитывались с помощью пакета 3DNA [22]. Зависимость структурных параметров ДНК от времени (фиксировались каждые 2 пс) была получена с помощью специально разработанной программы, написанной на языке FORTRAN.

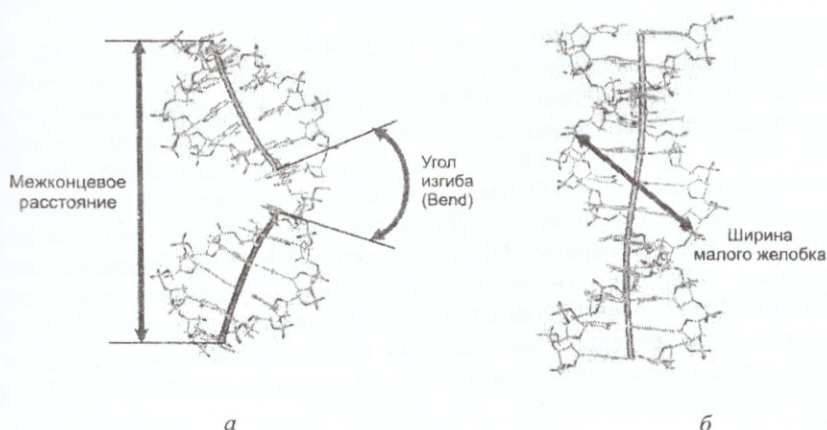


Рис. 1. ДНК из комплекса пуриновый репрессор – ДНК (PurR-DNA) (а), и модель свободной ДНК (B-DNA) (б). Оси ДНК проведены через центры пар оснований. Показаны параметры, которые были проанализированы в данной работе, а именно: угол изгиба Bend, ширина желобка и межконцевое расстояние.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Так как целью данной работы являлось изучение молекулярных механизмов релаксации изгибных деформаций ДНК, мы построили зависимости структурных параметров, которые описывают изгиб, от

времени моделирования. Такими параметрами являются угол Крена (Roll), который описывает изгиб дуплекса в желобок, и угол Наклона (Tilt), описывающий изгиб дуплекса ДНК поперек желобка [23]. Необходимо отметить, что оба эти параметра определяются взаимным расположением соседних пар оснований в динуклеотидном контакте и, таким образом, они характеризуют только изгиб, локализованный на определенном контакте.

В целом, изгиб ДНК на каждом нуклеотидном шаге может быть охарактеризован углом Изгиба (Bend), который является геометрической суммой углов Крена (Roll) и Наклона (Tilt):

$$Bend = \sqrt{Roll^2 + Tilt^2} \quad (1)$$

Полученная временная эволюция изменения этих структурных параметров в течении 2 нс для обеих систем приведена на рис.2.

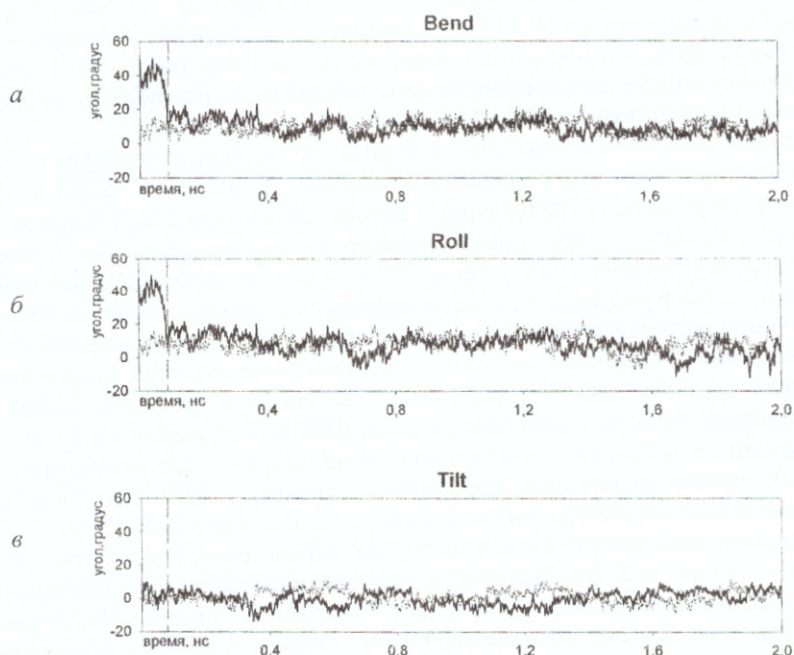


Рис.2. График изменения значений угла Bend (а), Roll (б), Tilt (с) на центральном контакте CpG в течении 2 нс. ДНК из комплекса PurR-DNA (жирная линия) в сравнении со свободной В-ДНК (пунктирная линия).

Была обнаружена значительная разница значений угла Bend для обеих систем только в течение первых 100 пс (рис.2, а). Среднее значение угла Bend первые 100 пс системы PurR-DNA равнялось $\sim 35.27^\circ$ по сравнению с $\sim 8.23^\circ$ для системы В-DNA (изменение в 4.29 раза). В тоже время на протяжении остального моделирования среднее значение угла Bend оставалось близким для обеих систем (для системы PurR-DNA $\sim 9.05^\circ$; В-DNA $\sim 9.67^\circ$). Так как значение угла изгиба Bend в равной мере определяется значениями углов Roll и Tilt (см. (1)), была проанализирована динамика изменений этих углов в течение того же временного интервала. Динамика изменений значений угла Roll была подобна динамике изменений угла Bend (в первые 100 пс для системы PurR-DNA среднее значение угла Roll $\sim 34.91^\circ$ по сравнению с $\sim 7.94^\circ$ для В-DNA (в 4.4 раза) (рис.2, б)). При дальнейшем моделировании средние значения угла Roll для обеих систем отличались незначительно (таблица 1). Средние значения угла Tilt во время всего моделирования практически не отличались для обеих систем и были близки к нулю (рис.2, в). Такие данные позволяют сделать вывод об основном вкладе угла Roll в увеличение угла Bend в формирование кинка в нашей системе.

Таблица 1. Среднее значение угла Крена (Roll) в течении моделирования на протяжении 2 нс (исключая первые 100пс) на контакте CpG для системы PurR-DNA и В-DNA.

	Среднее значение угла Roll
PurR-DNA	7.11
B-DNA	8.49

Изменение ширины большого и малого желоба

На следующем этапе был проведен сравнительный анализ изменения геометрии (главным образом, ширины) малого и большого желобков для систем PurR-DNA и B-ДНК в процессе моделирования. Значительные отличия ширины малого желобка двух систем заметны в течение первых 200 пс (рис.3, а). Среднее значение ширины малого желобка системы PurR-DNA значительно больше (17.34 Å), чем ширина малого желобка системы B-DNA (13.04 Å). Следует отметить, что релаксация системы PurR-DNA в течении первых 200 пс происходит в две стадии. Первая стадия (~ 100 пс) может быть охарактеризована относительно высоким средним значением ширины желобка, а именно, 19.30 Å. Эта стадия соответствует увеличенным значениям угла Roll (см. рис. 2,б). Вторая стадия (100-200 пс) характеризуется средней шириной желобка 15.38 Å, что больше чем среднее значение для B-DNA. На протяжении остального моделирования существенных различий в ширине малого желобка для обеих систем не наблюдалось. Средние значения составляли 13.04 Å (PurR-DNA) и 13.82 Å (B-DNA), что при наблюдаемых значениях флуктуаций не является статистически значимым.

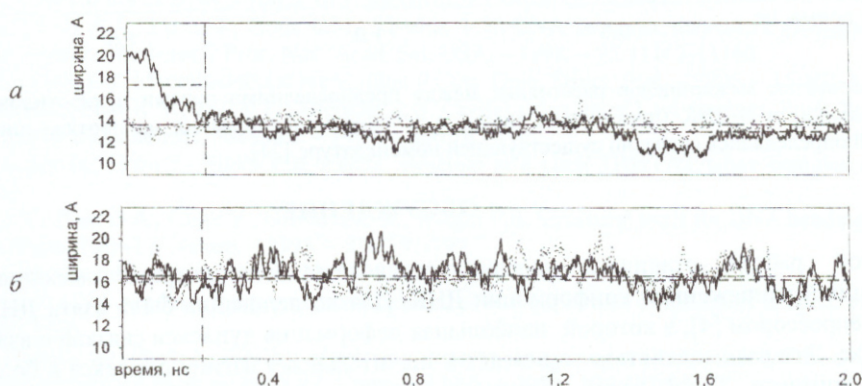


Рис.3 Ширина малого (а) и большого (б) желобков системы PurR-DNA (жирная линия) и B-ДНК (пунктирная линия) на центральном контакте CpG в течение моделирования на протяжении 2 нс (а). Мелко-штриховая линия соответствует среднему значению ширины желобка системы B-DNA; штриховая линия – среднему значению ширины желобка системы PurR-DNA.

Интересно, что в значениях ширины большого желобка подобных отличий не наблюдалось, и в течение всего моделирования динамика поведения кривых обеих систем была подобной (рис.3, б). Средние значения ширины большого желобка для систем PurR-DNA и B-DNA равнялись 16.75 Å и 16.53 Å соответственно.

Для дальнейшей характеристики геометрии желобков были рассчитаны минимальные и максимальные значения их ширин (таблица 2). Эти значения для большого желобка, как и предполагалось, очень близки. Однако, существенное отличие можно заметить для максимальных значений ширины малого желобка, разница между PurR-DNA и B-ДНК составляет 4.65 Å (~30% средней ширины малого желобка B-ДНК).

Таблица 2. Максимальные и минимальные значения ширины малого и большого желобка на центральном контакте CpG в течении моделирования на протяжении 2 нс для систем PurR-DNA и B-DNA.

		Ширина желобка, Å	
		PurR-DNA	B-DNA
Малый желобок	Максимум	20.67	16.02
	Минимум	10.25	11.65
Большой желобок	Максимум	20.66	20.94
	Минимум	13.4	13.33

Межконцевое расстояние

Для того, чтобы более полно охарактеризовать изменения в конфигурации дуплекса ДНК, было рассмотрено межконцевое расстояние, которое описывает конформацию ДНК в целом, в отличие от локальных характеристик, рассмотренных выше. Был проведен сравнительный анализ временной

эволюции кратчайшего межконцевого расстояния двух систем: PurR-DNA и B-DNA. Межконцевое расстояние рассчитывалось как расстояние между предпоследними парами нуклеотидов, для того, чтобы избежать возникновения погрешностей, связанных с концевыми эффектами. В случае системы B-DNA кратчайшее межконцевое расстояние в течение первых 400 пс заметно больше, чем у системы PurR-DNA. Наибольшая разница наблюдается в течение первых 200 пс. При дальнейшем моделировании межконцевые расстояния обеих систем статистически не отличаются. Результаты представлены на рис.4.

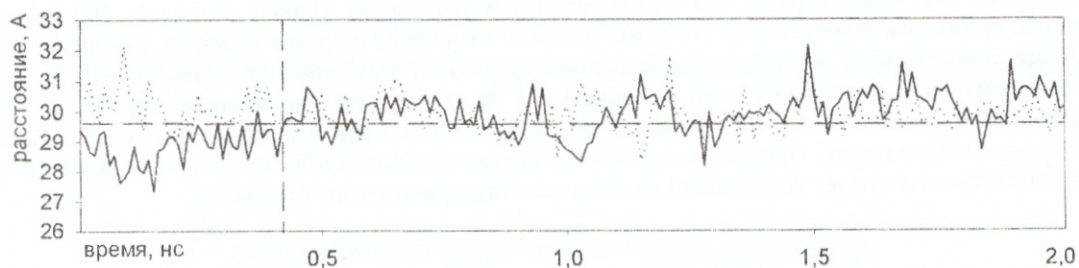


Рис.5 Кратчайшее межконцевое расстояние между предпоследними парами нуклеотидов систем PurR-DNA (жирная линия) и B-ДНК (пунктирная линия) в течение моделирования на протяжении 2 нс. Центры пар оснований определялись согласно существующей номенклатуре [24].

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе ставилась задача исследовать молекулярные механизмы релаксации деформированной напряженной конформации ДНК. Для исследования была взята ДНК из комплекса с пуриновым репрессором [4], в которой наибольшая деформация дуплекса связана с взаимодействиями в малом желобке. Эти взаимодействия приводят к значительному изгибу дуплекса в большой желобок на центральном контакте. Такой изгиб описывается изменением угла Крен (Roll), и поэтому различие именно в этом параметре было рассмотрено на начальном этапе нашего исследования. Релаксация значений угла Крен носила скачкообразный характер. Скачок происходил в узком интервале в районе 100 пс до значений, характерных для релаксированной B-ДНК. Уменьшение угла Крен можно трактовать как «закрытие» динуклеотидного контакта, что уменьшает доступность атомов ДНК и, таким образом, делает конформацию менее благоприятной для взаимодействия с белком со стороны малого желобка [7].

Такая динамика структуры ДНК сопровождалась уменьшением ширины малого желобка, но в течение несколько большего временного интервала, а именно, в течение 200 пс. После этого времени ширина малого желобка достигала значений, характерных для B-ДНК, и не изменялась в дальнейшем моделировании. Уширение малого желобка в комплексе PurR-DNA сопровождается уменьшением его глубины, что так же, как и увеличение угла Крен, приводит к росту доступности оснований со стороны этого желобка. Эти данные согласуются с результатами, полученными для других комплексов (например, TBP-DNA [5], LEF-1-DNA [6]), где было показано, что раскрытие малого желобка сопровождается кинкованием ДНК в большой желобок. Интересно отметить, что уменьшение ширины малого желобка не отразилось на ширине большого желобка, значение ширин которого заметно не менялось в течение всего моделирования и находилось в диапазоне значений, типичных для B-ДНК. То, что значения ширины большого желобка близки для системы PurR-DNA и для системы B-ДНК, может свидетельствовать о том, что взаимодействие с белком вызывает деформацию только малого желобка и значительно в меньшей степени влияет на большой желобок.

Описанные выше конформационные перестройки молекулы ДНК в области взаимодействия с белком не приводят к одновременному изменению более глобального параметра, описывающего структуру ДНК, а именно, расстояния между концами дуплекса. Результаты нашего моделирования системы PurR-DNA показывают, что межконцевое расстояние изменялось постепенно и процесс его приближения к значениям соответствующим релаксированной B-ДНК, продолжался в течение 400 пс. Таким образом, наши данные предполагают существование разных уровней перехода деформированной молекулы ДНК к релаксированной структуре, которые занимают разные временные интервалы. В данном случае, можно говорить о следующих характерных временных интервалах: (а) уровень пар оснований (описываемый параметрами пар оснований и динуклеотидных контактов, такими как угол Крена; самый короткий временной интервал релаксации ~100 пс); (б) уровень желобка (формируется 5-6 парами оснований и описывается параметрами ширины и глубины желобков; средний временной интервал релаксации ~200 пс); (в) уровень дуплекса (10 пар оснований и более; временной интервал релаксации ~400 пс).

ВЫВОДЫ

Анализ значений угла Крен (Roll), изменений ширины малого и большого желобка и межконцевого расстояния системы PurR-DNA в сравнении с системой В-ДНК сделал возможным оценку времени и механизмов релаксации изгибных деформаций ДНК.

Динамика изменения конформации от напряженной к релаксированной структуре ДНК, исследованная в данной работе, показывает, что изменение различных параметров имеет разные характерные времена. При этом релаксации локальных структурных параметров происходят на существенно меньших интервалах времени по сравнению с параметрами, описывающими конформацию дуплекса в целом, что свидетельствует о наличии различных уровней релаксации деформации структуры ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hagerman P.J. Flexibility of DNA // *Annu. Rev. Biochem.* – 1990. – 59:755-781.
- Olson W.K., Gorin A.A., Lu X.-J., Hock L.M., Zhurkin V.B. DNA sequence dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – 95:11163-11168.
- Deremble C., Lavery R. Macromolecular recognition // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2005. – 15:171-175.
- Schumacher M.A., Choi K.Y., Zalkin H., Brennan R.G. Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: minor groove binding by alpha helices // *Science.* – 1994. – 266:763-770.
- Kim Y.J., Geiger H., Hahn S., Sigler P.B. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex // *Nature.* – 1193. – 365:512-520.
- Love J.J., Li X., Case D.A., Giese R., Grosschedl R., Wright P.E. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1 // *Nature.* – 1995. – 376:791-795.
- Travers A.A. Reading the minor groove // *Nature Struct. Biol.* – 1995. – V.2 – P.615-618.
- Dickerson R. E. DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality // *Nucl. Acids Res.* – 1998. – V.26. – 1906-1926.
- Bosch D., Campillo M., Pardo L. Binding of proteins to the minor groove of DNA: what are the structural and energetic determinants for kinking a basepair step? // *J. Comput. Chem.* – 2003. – 24:682-691.
- Zacharias M. Minor groove deformability of DNA: a molecular dynamics free energy simulation study // *Biophys. J.* – 2006. – 91:882-891.
- Murphy F. V., Churchill M. E. Nonsequence-specific DNA recognition: a structural perspective // *Struct. Fold. Des.* – 2000. – V.8 – R83-R89.
- Glasfeld A., Koehler A.N., Schumacher M.A., Brennan R.G. The role of lysine 55 in determining the specificity of the purine repressor for its operators through minor groove interactions // *J. Mol. Biol.* – 1999. – V.291. – P.347-361.
- Tolstorukov M.Y., Jernigan R.L., Zhurkin V.B. Protein-DNA hydrophobic recognition in the minor groove is facilitated by sugar switching // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V.337. – P.65-76.
- Djuranovich D., Hartmann B. Molecular dynamics studies on free and bound targets of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein: the protein binding effect of DNA and the recognition mechanism // *Biophys. J.* – 2005. – 89. 2542-2551.
- Lu X.-J., Shakked Z., Olson W.K. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures // *J. Mol. Biol.* – 2000. – 300(4):819-840.
- El Hassan M.A., Calladine C.R. The assessment of the geometry of dinucleotide steps in double-helical DNA: a new local calculation scheme // *J. Mol. Biol.* – 1995. – 251:648-664.
- Newman E.B., Lin R. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene-expression in *Escherichia coli* // *Annu Rev Microbiol.* 1995 – 49. – 747-775.
- Nelson M., Humphrey W., Gursoy A., Dalke A., Kalé L., Skeel R.D., Schulten K. NAMD -- A Parallel, Object-Oriented Molecular Dynamics Program // *J. Supercomputing App.* – 1996. – 10. – 251-268.
- MacKerrel A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L., Evanseck J., Fried M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., Roux B., Schlenkrich M., Smith J., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiorkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M. Self-consistent parameterization of biomolecules for molecular modeling and condensed phase simulations // *FASEB J.* – 1992. – 6:A143.
- Luty B.A., Davis M. E., Tironi I. G., Vangunsteren W. F. A comparison of particle-particle, particle-mesh and Ewald methods for calculating electrostatic interactions // *Mol. Sim.* – 1994. – 14:11-20.
- Feller S.E., Zheng Y.H., Pastor R.W., Brooks B.R. Constant pressure molecular dynamics simulation-the Langevin piston method // *J. Comp. Phys.* – 1995. – 103:4613-4621.
- Lu X.-J., Olson W.K. 3DNA: A software package for the analysis, rebuilding, and visualization of three-dimensional nucleic acid structure // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – 31(17):5108-5121.
- Dickerson R.E. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1989. – 6: 627-634.
- Olson W.K., Lu X.-J., Westbrook J., Bansal M., Burley S.K., Dickerson R.E., Gerstein M., Harvey S.C., Heinemann U., Neidle S., Shakked Z., Suzuki M., Tung C.-S., Sklenar H., Westhof E., Wolberger C., Berman H.M. A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry // *J. Mol. Biol.* – 2001. – 313:229-237.