

УДК 577.32

## МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПИРАЛЬНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

**Е.В. Мирошниченко, А.В. Шестопалова**

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины*

*ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085*

*e-mail: [kateryna\\_mirosh@ire.kharkov.ua](mailto:kateryna_mirosh@ire.kharkov.ua)*

**Поступила в редакцию 28 ноября 2008 г.**

**Принята 22 декабря 2008 г.**

Известно, что полирибозитидиловая кислота (polyrC) существует в различных спиральных формах в зависимости от кислотности среды. При нейтральном pH polyrC принимает односпиральную форму, в кислой среде (pH 3.5 - 5.7) становится возможным образование мультицепочечных структур polyrC благодаря наличию полупротонированных пар C<sup>+</sup>-C, при pH < 3.5 polyrC существует в виде неупорядоченного клубка. В литературе ведется дискуссия относительно спиральной формы polyrC в интервале pH 3.5 - 5.7. Есть доказательства как в пользу дуплекса, так и в пользу четырехспиральной формы (i-мотива). В связи с этим, исследование спиральных форм polyrC представляет особый интерес. В данной работе проведено молекулярно-динамическое моделирование односпиральной формы polyrC r(C<sub>10</sub>), дуплекса [r(C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>] и двух топологий 3'E и 5'E i-мотива polyrC [r(C<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]. Получены стабильные 5 нс траектории для 3'E и 5'E топологий четырехспиральной polyrC [r(C<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]. Водородные связи между основаниями в C<sup>+</sup>-C парах i-мотива сохранялись в течение всей траектории. В желобках i-мотива были обнаружены водородные связи и водные мостики, соединяющие цепи, относящиеся к разным дуплексам. Характерные для i-мотива СН---О водородные связи в малых желобках отсутствовали в течение большей части траектории. Исследованные нами модели двухспиральной polyrC [r(C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>] (helical rise = 3.11 Å, helical twist = 30° и helical rise = 3.11 Å, helical twist = 44°) оказались неустойчивыми и разрушились в процессе моделирования. Если polyrC существует в виде дуплекса, то его структура существенно отличается от изученных моделей. Структура односпиральной polyrC r(C<sub>10</sub>) претерпела значительные изменения в процессе моделирования: среднеквадратическое отклонение относительно первого снимка траектории составило ~ 5 Å. Наблюдалось значительное нарушение стэкинга оснований. Возможно, к этому привело наличие большого числа внутримолекулярных водородных связей в структуре односпиральной polyrC в молекулярно-динамической траектории. В процессе моделирования были зафиксированы переходы сахаров из C3'-endo в C2'-endo конформацию. В случае четырехспиральной polyrC большая часть сахаров осталась в C3'-endo и C4'-exo конформациях, а в случае односпиральной polyrC большинство сахарных остатков перешли в нехарактерную для нее C2'-endo конформацию.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** молекулярно-динамическое моделирование, полирибозитидиловая кислота, протонированный цитидин, i-мотив, водородные связи, водные мостики.

Известно, что полирибозитидиловая кислота (polyrC) может существовать в различных спиральных конформациях в зависимости от кислотности среды [1]. Так, в нейтральной среде polyrC, согласно литературным данным [2], находится в одноцепочечной форме и образует правую спираль с такими параметрами: расстояние между соседними нуклеотидами вдоль оси спирали (helical rise) 3.11 Å, угол спирального вращения (helical twist) 60° (Рис. 1 а). При повышении кислотности среды происходит протонирование цитидина в положении N3, и образуются полупротонированные пары C<sup>+</sup>-C, в стабилизации которых участвуют три водородные связи: N4-N41---O2, N3-N3---N3, O2---N41-N4 (Рис. 2) [3]. Благодаря наличию C<sup>+</sup>-C пар становится возможным образование мультицепочечных структур polyrC в интервале pH 3.5 - 5.7. Дальнейшее повышение кислотности среды (pH < 3.5) приводит к разрушению водородно связанных C<sup>+</sup>-C пар из-за протонирования второго цитидина в

паре и, как следствие, — к разрушению мультицепочечных форм polyrC. В этом интервале рН polyrC существует в виде неупорядоченного клубка [4].

В литературе существуют разногласия относительно спиральной формы polyrC в интервале рН 3.5 – 5.7. Еще в 1963 г. Лангридж и Рич предложили модель дуплекса polyrC с параллельным расположением цепей и следующими спиральными параметрами: helical rise = 3.11 Å, helical twist = 30° [5]. Ось спирали являлась осью симметрии второго порядка для каждой из цепей дуплекса, и два желобка двойной спирали были одинаковыми (Рис. 1 b). Однако, впоследствии так и не удалось получить координаты атомов двухспиральной polyrC. А данные работы [5] интерпретировались позднее как односпиральная polyrC.

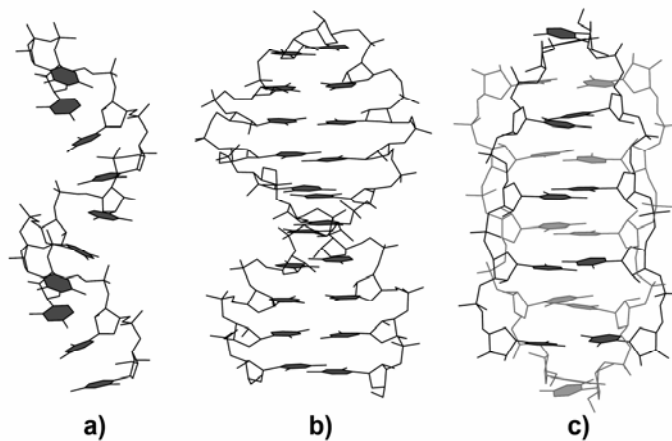


Рис.1. Различные спиральные формы polyrC: а) - односпиральная форма; б) - дуплекс; в) - i-мотив. В i-мотиве polyrC один из дуплексов показан серым цветом, а другой – черным.

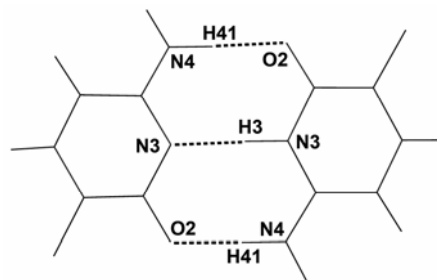


Рис.2. Водородные связи в C<sup>+</sup>-C паре. Правый цитозин протонирован в положении N3.

С другой стороны, в 2001 г. Snoussi et al методом ЯМР спектроскопии была получена четырехспиральная структура для обогащенных цитидином олигорибонуклеотидов в кислой среде (рН = 4.3) – так называемый i-мотив [6]. Эта структура образуется в результате интеркаляции друг в друга двух параллельных дуплексов, состоящих из C<sup>+</sup>-C пар (Рис. 1 c). Дуплексы по отношению друг к другу антипараллельны. В структуре i-мотива есть два широких и два узких желобка. Ранее i-мотив был обнаружен для коротких фрагментов polydC [7] и богатых цитидином теломерных и центромерных последовательностей ДНК [8,9]. Структура полученного РНК i-мотива [r(UC<sub>5</sub>)<sub>4</sub>] практически не отличалась от его ДНК аналога [d(TC<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]: расстояние между расположенными рядом парами оснований в стопке 3.1-3.2 Å, средний угол спирального вращения в дуплексе 19°. Однако, его стабильность была существенно меньше: так, при концентрации олигонуклеотида равной 9.8 mM и рН = 4.3

температура плавления  $[r(UC_5)]_4$  составила всего лишь  $12\text{ }^\circ\text{C}$ , тогда как для  $[d(TC_5)]_4$  при аналогичных условиях она равнялась  $69\text{ }^\circ\text{C}$ . Время жизни  $i$ -мотива РНК  $[r(UC_5)]_4$  при  $0\text{ }^\circ\text{C}$  составляет около 1.5 минуты, а ДНК  $i$ -мотив  $[d(TC_5)]_4$  при  $2\text{ }^\circ\text{C}$  существует в течение нескольких часов [6]. Малое время жизни  $i$ -мотива  $[r(UC_5)]_4$  объясняет тот факт, что гель-фильтрационная хроматография, проведенная ранее для определения стехиометрии мультицепочечной структуры  $r(UC_5)$ , показала наличие дуплекса, а не тетраплекса [10]. В этом случае время проведения эксперимента (7 мин.) превышало время существования  $i$ -мотива  $[r(UC_5)]_4$  (1.5 мин.). Дестабилизирующий эффект замены дезоксирибозы на рибозу в литературе [11] объясняют ослаблением благоприятных гидрофобных взаимодействий между сахарами в малых желобках  $i$ -мотива и отталкивающими взаимодействиями между гидроксильными группами 2'-ОН рибоз соседних цепей. Даже замена одной дезоксирибозы на рибозу приводит к понижению температуры плавления  $i$ -мотива на  $7\text{-}10^\circ$ .

Несмотря на наличие большого числа экспериментальных свидетельств существования  $i$ -мотива для различных последовательностей ДНК и РНК [6-9,12,13], теоретическое объяснение его стабильности до сих пор не дано. Квантовохимические расчеты, сделанные Sponger et al [14], показали, что вследствие отталкивания протонированных цитозинон стэкинг между соседними парами оснований в  $i$ -мотиве сильно дестабилизирует структуру в условиях вакуума ( $+33$  ккал/моль). В то же время, ион-дипольные взаимодействия между протонированным и непротонированным цитозинами в  $C^+-C$  паре стабилизируют структуру  $i$ -мотива ( $-45$  ккал/моль). Еще один неблагоприятный фактор — это близкое расположение заряженных фосфатных групп в малых желобках  $i$ -мотива. В то же время, с другой стороны, узкие желобки  $i$ -мотива способствуют образованию  $CN---O$  водородных связей (ВС) между сахарами соседних цепей [15]. В зависимости от того, какие концы цепей образуют внешние пары интеркалированной стопки оснований, для  $i$ -мотива выделяют две топологии: 3'E и 5'E. В случае 3'E топологии в малых желобках  $i$ -мотива находится на одну пару больше близко расположенных сахаров, которые могут образовывать  $CN---O$  ВС. ЯМР эксперименты по определению равновесного отношения концентраций 5'E и 3'E топологий  $i$ -мотива показали, что разность энергий между 3'E и 5'E формой составляет  $-5.2$  кДж/моль [16], т.е. на одну  $CN---O$  ВС приходится всего лишь  $2.6$  кДж/моль. Столь малая энергия ВС говорит о том, что наличие  $CN---O$  ВС не может быть единственным объяснением стабильности  $i$ -мотива.

Исследование  $i$ -мотива ДНК с помощью компьютерного моделирования методом молекулярной динамики показало, что его структура является стабильной в наносекундном интервале [17]. Это свидетельствует о том, что современные молекулярно-механические силовые поля способны адекватно описывать даже такие неканонические структуры нуклеиновых кислот, как  $i$ -мотив. Анализ вкладов различных сил в стабилизацию  $i$ -мотива показал, что его структура поддерживается за счет благоприятных электростатических взаимодействий между основаниями в  $C-C^+$  паре; за счет экранирующего действия растворителя, так как вода ослабляет сильное электростатическое отталкивание между протонированными цитозинами в стопке пар оснований и расталкивание между отрицательно заряженными фосфатными группами в малых желобках  $i$ -мотива; за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий между сахарофосфатными остовами разных цепей в малых желобках  $i$ -мотива и гидрофобных взаимодействий вследствие уменьшения площади поверхности, доступной растворителю, при интеркаляции дуплексов друг в друга [18]. По данным расчетов [19] 3'E топология  $i$ -мотива ДНК является более энергетически выгодной, чем 5'E форма (в согласии с экспериментальными данными) из-за дополнительных ван-дер-ваальсовых

взаимодействий между сахарами в малых желобках *i*-мотива. Однако, для *i*-мотива РНК по данным ЯМР спектроскопии энергетически предпочтительной является не 3'E, а 5'E топология [6]. Таким образом, природа сахарофосфатного остова имеет большое значение для структуры *i*-мотива.

Согласно литературным данным короткие фрагменты ДНК, содержащие С-тракты, образуют устойчивый *i*-мотив даже в нейтральной среде [20]. Изучение влияния различных химических модификаций остова на способность аналогов нуклеиновых кислот, содержащих цитидиновые тракты, к образованию *i*-мотива показало, что фосфоротиоатные производные ДНК в кислой среде образуют *i*-мотив, сравнимый по стабильности с *i*-мотивом ДНК, тогда как метилфосфонатные и фосфорамидатные аналоги ДНК и О2'-метилированные производные РНК не способны к формированию такой структуры [21]. Недавно было доказано существование *i*-мотива для С-обогащенных фрагментов пептидонуклеиновых кислот (ПНК) – синтетических аналогов ДНК, у которых сахарофосфатный остов заменен на нейтральную полиамидную цепь [22,23]. При рН=4.3 температура плавления *i*-мотива ПНК [p(C<sub>5</sub>T)]<sub>4</sub> была сравнима с температурой плавления его ДНК аналога d(C<sub>5</sub>T)]<sub>4</sub>, но интервал допустимых значений рН для *i*-мотива ПНК был существенно более узким: 4.1 – 4.5. Еще одной нуклеиновой кислотой с химической модификацией остова является закрытая нуклеиновая кислота (ЗНК) – аналог РНК, в котором атомы О2' и С4' соединены метиленовым мостиком, что фиксирует сахар в конформации С3'-endo. В работе [24] было показано, что введение в состав олигонуклеотида ДНК d(ТC<sub>5</sub>) 2-х остатков ЗНК может привести к стабилизации *i*-мотива. Однако, в случае практически полного замещения остатков ДНК на ЗНК *i*-мотив получить не удалось.

Анализ структуры гибридных *i*-мотивов ДНК-ПНК [25], РНК-ПНК [26] и ДНК-РНК [27] с помощью метода тушения флуоресценции обнаружил, что во всех случаях *i*-мотив образован в результате интеркаляции друг в друга гетеродуплексов таким образом, что цепи одного химического состава находятся в близком контакте в малых желобках *i*-мотива. Это еще раз подчеркивает важную роль взаимодействий между сахарами в малых желобках *i*-мотива. Стабильность гибридного ДНК-ПНК *i*-мотива была больше, чем его ДНК аналога, тогда как гибридный ДНК-РНК *i*-мотив уступал в стабильности *i*-мотиву ДНК и имел существенно более низкую температуру плавления. Со временем для гибридного ДНК-РНК *i*-мотива наблюдался переход в ДНК *i*-мотив и односпиральную РНК.

Вследствие недостаточной стабильности *i*-мотива коротких фрагментов РНК, многие исследователи продолжают интерпретировать результаты, полученные для polyC в кислой среде как для двухспиральной формы [28,29], считая ее более устойчивой, чем возможная альтернативная четырехспиральная форма. Недавно было проведено сравнение динамики возбужденных состояний polyC (при рН = 4) и олигонуклеотида ДНК d(C<sub>18</sub>) (при рН=6.8) с помощью спектроскопии нестационарного поглощения и разрешенной во времени эмиссионной спектроскопии [30]. Для обоих веществ были получены одинаковые формы выходных сигналов и одинаковое время жизни возбужденных состояний ~100 пс, что свидетельствует о сходной геометрии стэкинга оснований в polyC и d(C<sub>18</sub>). Считая, что d(C<sub>18</sub>) находится в форме *i*-мотива, авторы предположили, что более вероятной является четырехспиральная форма polyC.

В связи с тем, что РНК *i*-мотив малоизучен, а цитидиновые тракты, способные к образованию *i*-мотива, содержатся в мРНК многих организмов [6], молекулярное моделирование структуры *i*-мотива polyC представляет особый интерес. Кроме того, до сих пор нет однозначного ответа на вопрос, в какой спиральной форме существует polyC в интервале рН 3.5 – 5.7: двухспиральной или четырехспиральной. Задачей

данной работы было исследование стабильности различных спиральных форм polyC с помощью компьютерного моделирования методом молекулярной динамики. В качестве объектов моделирования нами были выбраны односпиральная polyC  $\tau(C_{10})$ , дуплекс polyC  $[\tau(C_{10})]_2$  и две топологии 3'E и 5'E i-мотива polyC  $[\tau(C_5)]_4$ . Мы хотели выяснить, будут ли данные спиральные формы polyC сохранять свою структуру, по крайней мере, во временном интервале  $\sim 5$  нс в условиях явного учета ион-гидратного окружения. Для качественной характеристики стабильности этих структур был проведен анализ наличия внутримолекулярных водородных связей и водных мостиков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение зарядов для протонированного цитидина

Поскольку протонированный цитидин не является стандартным остатком силового поля AMBER, прежде всего, нужно было получить необходимые для молекулярно-динамического моделирования параметры. К C3'-endo конформации рибозитидина мы добавили атом водорода в положении N3 и полученную структуру оптимизировали методом B3LYP в базе 6-31 G(d) в программе Gaussian 03 [31], накладывая ограничения на значения нескольких торсионных углов для того, чтобы геометрия оптимизированного нуклеозида как можно лучше совпадала с геометрией рибозитидина, для которой рассчитывались заряды в силовом поле AMBER 94 [32,33] и 99 [34]. Для оптимизированного нуклеозида в трех системах координат (C4 C2 C6 | N1 C5 N3 | O4' C2' N4), заданных по трем атомам с помощью программы REDII [35], рассчитывался электростатический потенциал в программе GAMESS [36] методом Хартри-Фока в базе 6-31 G(d). Полученные значения электростатического потенциала использовались для расчета парциальных зарядов на атомах протонированного рибозитидина по resp-методологии в модуле RESP программного пакета AMBER 8 [37]. При этом, в процессе расчета заряды на всех атомах рибозы, кроме атомов C1' и H1', не менялись и соответствовали зарядам рибонуклеозидов из силового поля AMBER 99. Полученные заряды для протонированного цитидина приведены на рис. 3. Атому N3 в протонированном цитидине присваивался тип NA, а присоединенному к нему водороду H3 – тип H. Отсутствующие в силовом поле AMBER параметры для угла CM-CA-NA были взяты такие же, как у Spomer et al [17].

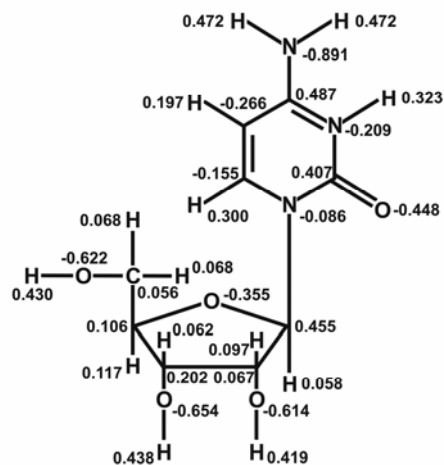


Рис.3 Парциальные заряды на атомах протонированного цитидина в а.е.

### Моделирование методом молекулярной динамики

В качестве объектов моделирования были выбраны односпиральная форма polyrC r(C<sub>10</sub>), дуплекс polyrC [r(C<sub>10</sub>)]<sub>2</sub> и две топологии 3'E и 5'E i-мотива polyrC [r(C<sub>5</sub>)]<sub>4</sub>. Структура односпиральной polyrC была построена по данным Арнотта [2]. Дуплекс polyrC мы строили с помощью собственного программного обеспечения, используя значения спиральных параметров helical rise = 3.11 Å, helical twist = 30°, полученные в работе [5]. Каждая цепь дуплекса состояла из чередующихся остатков цитидина и протонированного цитидина таким образом, чтобы в каждой паре оснований один из цитозинов был протонирован.

Начальные координаты 5'E топологии i-мотива [r(C<sub>5</sub>)]<sub>4</sub> были получены из ЯМР структуры [r(UC<sub>5</sub>)]<sub>4</sub> (PDB индекс 1i9k, [6]). Концевые уридины мы удаляли, а к атомам N3 цитидинов добавляли водород таким образом, чтобы в каждой паре оснований был один протонированный цитозин, и каждая цепь состояла из чередующихся обычных и протонированных остатков цитидина. Координаты 3'E топологии были получены из 5'E в результате перемещения одного из дуплексов относительно другого на 6.22 Å вдоль спиральной оси i-мотива.

Оптимизация геометрии и молекулярная динамика структур проводилась в модуле SANDER программного пакета AMBER 8 [37] с силовым полем parm99 [34]. Координаты начальных структур были оптимизированы с неявным учетом растворителя с помощью обобщенной модели Борна (igb=1) [38] с радиусом отсечки равным бесконечности. Сначала оптимизировались положения атомов водорода в течение 2000 циклов, из которых первые 500 выполнялись методом наискорейшего спуска (НС), а остальные методом сопряженного градиента (СГ). Затем для двухспиральной и четырехспиральной форм polyrC в четыре этапа по 2000 циклов (500 НС, 1500 СГ) выполнялась оптимизация атомов сахарофосфатного остова с постепенным снятием ограничений с атомов оснований (силовая константа ограничений была равна 500, 50, 10 и 5 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>)). После этого в течение 2000 циклов (500 НС, 1500 СГ) проводилась оптимизация всей структуры без ограничений.

К оптимизированной структуре в модуле XLEAP было добавлено необходимое для нейтрализации системы число ионов K<sup>+</sup>. Ионы K<sup>+</sup> были выбраны в качестве противоионов для polyrC по ряду причин: 1) известно, что концентрация K<sup>+</sup> во внутриклеточной среде превышает концентрации других моновалентных катионов; 2) согласно литературным данным K<sup>+</sup> играет важную роль в стабилизации структуры РНК [39,40]; 3) эксперименты, проводимые в нашей лаборатории, были выполнены с калиевой солью polyrC [28]. После этого вся система помещалась в параллелепипед с водой (модель воды TIP3P [41]) так, чтобы толщина водного слоя составляла не менее 10 Å для любого атома polyrC, и накладывались периодические граничные условия. Сначала на положения атомов polyrC накладывались сильные ограничения (силовая константа ограничений равнялась 500 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>)) и оптимизировались положения молекул воды и противоионов (5000 циклов: 500 НС, 4500 СГ). После этого проводилось еще 10000 циклов оптимизации (1000 НС, 9000 СГ) для всей системы. Учет электростатических взаимодействий осуществлялся с помощью метода частица-ячейка Эвальда [42]. Радиус отсечки при вычислении ван-дер-ваальсовых взаимодействий и прямой суммы Эвальда был равен 10 Å. Оптимизированная система нагревалась при постоянном объеме в течение 20 пс от 0 до 300 К со слабыми ограничениями (10 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>)) на положениях атомов polyrC. Длины связей с участием атома водорода были фиксированы с помощью алгоритма SHAKE, что позволило увеличить шаг моделирования до 2 фс. Температура контролировалась с

помощью термостата Ланжевена ( $\text{ntt}=3$ ) [43], частота столкновений была равна  $1 \text{ ps}^{-1}$ . После нагрева система уравнивалась в течение 1 нс при постоянном давлении ( $p = 1 \text{ атм}$ ) и температуре ( $T = 300 \text{ К}$ ). Затем следовала продукционная фаза моделирования, которая длилась 5 нс. Снимки системы записывались через каждую пикосекунду моделирования.

Анализ траектории проводился с помощью модуля PTRAJ. Водородные связи (ВС) определялись по геометрическому критерию: расстояние между донором и акцептором ВС должно было быть не больше  $3.2 \text{ \AA}$ , расстояние между водородом и акцептором ВС - не больше  $2.7 \text{ \AA}$ , а угол, образованный донором ВС, водородом и акцептором ВС – не менее  $120^\circ$ . Анализ конформации сахаро-фосфатного остова был выполнен с помощью программы 3DNA [44]. Для визуализации траекторий использовалась программа VMD [45].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Модель двухспиральной polyrC

Еще в процессе оптимизации с неявным учетом растворителя, на последнем этапе, когда были сняты ограничения с положений атомов оснований, структура двухспиральной polyrC значительно деформировалась: произошло нарушение планарности оснований в парах и разрыв водородных связей, соединяющих основания. Мы пробовали изменить протокол моделирования и снимать ограничения с положений атомов оснований двухспиральной polyrC после добавления и оптимизации растворителя. Однако результат остался прежним. Поскольку продолжать моделирование с настолько деформированной структурой дуплекса polyrC дальше не имело смысла, мы провели поиск альтернативной модели двухспиральной polyrC, варьируя значение угла спирального вращения (helical twist) от  $20^\circ$  до  $70^\circ$  с шагом  $1^\circ$  при неизменном значении helical rise =  $3.11 \text{ \AA}$ . Для каждой такой структуры проводилась оптимизация сахарофосфатного остова с неявным учетом растворителя с помощью обобщенной модели Борна с радиусом отсечки, равным бесконечности, в течение 2000 циклов, из которых первые 500 выполнялись методом наискорейшего спуска, а остальные - методом сопряженного градиента. На рис. 4 представлена зависимость энергии оптимизированных структур дуплекса polyrC от значения угла спирального вращения. Видно, что минимуму энергии соответствует значение угла спирального вращения равное  $44^\circ$ . Мы провели для этой структуры оптимизацию с помощью нашего протокола, и оказалось, что в этой структуре водородные связи между основаниями в парах сохраняются, и структура дуплекса после оптимизации меняется незначительно. Эту модель дуплекса polyrC (helical rise =  $3.11 \text{ \AA}$ , helical twist =  $44^\circ$ ) мы использовали для дальнейшего моделирования.

### Среднеквадратическое отклонение различных спиральных форм polyrC от структур сравнения

Стабильность молекулярно-динамической траектории можно характеризовать с помощью среднеквадратического отклонения (СКО), вычисленного относительно структуры сравнения. На рис. 5 приведены зависимости СКО, вычисленного по всем атомам относительно первого снимка траектории, для различных спиральных форм polyrC от времени моделирования. Видно, что обе топологии ( $3'E$  и  $5'E$ ) четырехспиральной polyrC являются довольно стабильными: их СКО относительно

стартовых структур колеблется вблизи 2 Å. Для односпиральной polyrC величина СКО в среднем составила около 5 Å. Это свидетельствует о том, что структура односпиральной polyrC достаточно сильно изменяется в процессе моделирования. Визуальный анализ траектории показал, что для односпиральной polyrC наблюдается нарушение стэкинга оснований, выпадение оснований из стопки и растяжение структуры вдоль спиральной оси. Структура односпиральной polyrC скорее напоминает статистический клубок, чем упорядоченную спираль, хотя между соседними нуклеотидами периодически возникают стэкинг-взаимодействия (Рис. 6 а).

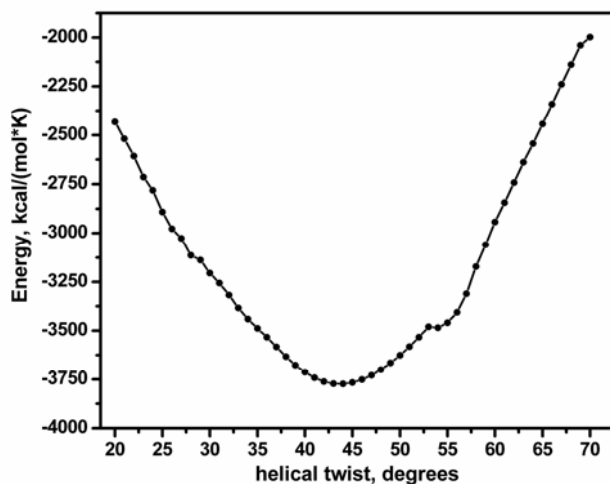


Рис. 4. Зависимость энергии оптимизированного дуплекса polyrC от угла спирального вращения (helical twist). Во всех моделях было использовано значение helical rise = 3.11 Å.

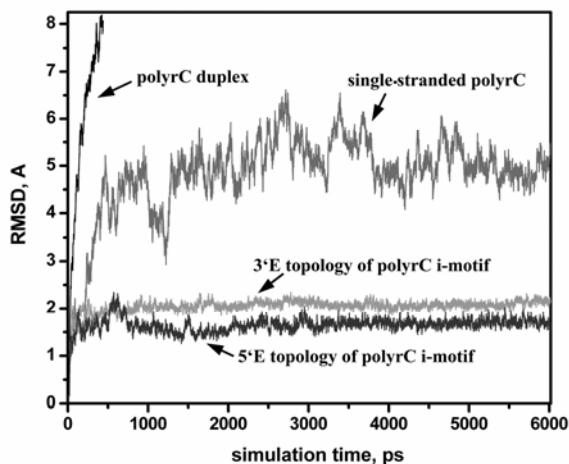


Рис. 5. Зависимости СКО, вычисленного по всем атомам относительно первого снимка траектории, для различных спиральных форм polyrC от времени моделирования

Для качественной характеристики стэкинга в односпиральной polyrC мы использовали площадь перекрытия между атомами соседних оснований (включая экзоциклические группы колец), вычисляемую с помощью программы 3DNA. В кристаллографической структуре односпиральной polyrC площадь перекрытия двух



соседних оснований составляет  $4.79 \text{ \AA}^2$ . В таблице 1 приведены значения площади перекрытия для разных шагов односпиральной polyC, усредненные по всем снимкам продукционной фазы траектории. Видно, что для всех шагов площадь перекрытия существенно меньше, чем в кристаллографической структуре. Наилучшее перекрытие наблюдается для центрального шага (между 5-м и 6-м остатками) односпиральной polyC: в этом случае площадь перекрытия составляет  $2.29 \text{ \AA}^2$ , что соответствует такому же стэкингу, как в кристаллографической структуре, в течение 48 % времени продукционной фазы траектории.

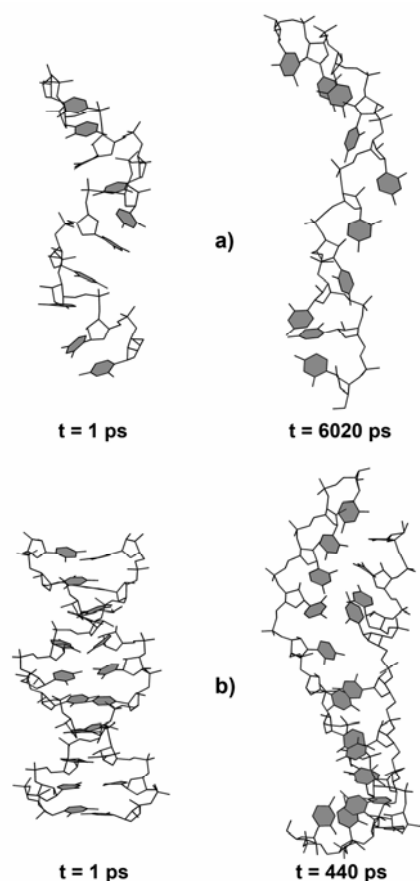


Рис. 6. Структура односпиральной (a) и двухспиральной (b) форм polyC в начале и конце моделирования.

Таблица 1. Средние значения площадей перекрытия между соседними остатками в односпиральной polyC в процессе молекулярно-динамического моделирования.

Шаг односпиральной polyC	Площадь перекрытия ( $\text{\AA}^2$ )	Стандартное отклонение ( $\text{\AA}^2$ )
1	1.49	1.68
2	2.02	2.76
3	0.24	0.69
4	0.32	0.98
5	2.29	1.81
6	1.00	1.45
7	0.15	0.50
8	1.13	1.84
9	0.65	1.27

Для двухспиральной polyrC наблюдалось резкое увеличение СКО до 8 Å в течение первых 400 пс фазы уравнивания. Столь высокое значение СКО говорит о том, что в структуре молекулы произошли кардинальные изменения. И действительно, визуальный анализ траектории в VMD показал, что структура дуплекса polyrC разрушается в процессе моделирования: происходит разрыв водородных связей между основаниями в C<sup>+</sup>-C парам и наблюдается расхождение цепей (Рис. 6 б). Поэтому мы решили не продолжать дальше моделирование дуплекса polyrC.

### Анализ наличия водородных связей в структурах односпиральной и четырехспиральной polyrC

Для траекторий односпиральной polyrC и двух топологий (3'E и 5'E) i-мотива polyrC мы проводили анализ наличия водородных связей с помощью модуля ptraj пакета AMBER 8. В структуре односпиральной polyrC наблюдались ВС между соседними остатками цепи с участием атомов O1P---H42-N4 (рис. 7 а). Кроме того, 2' -ОН-группа рибозы участвовала в бифуркационных ВС O5'---HO2' и O4'---HO2' (рис. 7 б.). Также были зафиксированы водные мостики между атомами O2P и N4 разных остатков односпиральной polyrC, они существовали около 30 % времени траектории. Возможно, присутствие большого числа внутримолекулярных ВС и водных мостиков в структуре односпиральной polyrC при моделировании ее в воде и является причиной нарушения стэкинга оснований и сильного отклонения конформации polyrC от кристаллографической структуры.

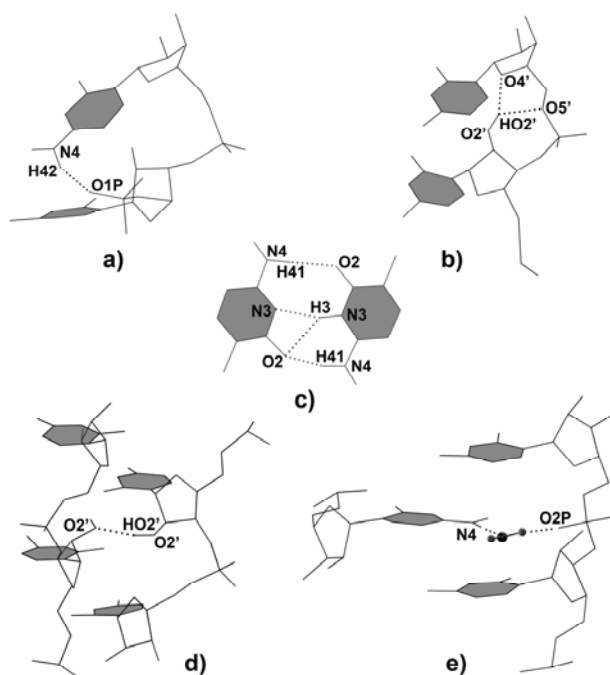


Рис. 7. Внутримолекулярные водородные связи и водные мостики в структуре односпиральной polyrC и i-мотива polyrC. Водородные связи показаны пунктиром. а) и б) – ВС между соседними остатками в односпиральной polyrC; в) – ВС между основаниями в C<sup>+</sup>-C паре i-мотива polyrC; д) – ВС, соединяющие цепи разных дуплексов i-мотива, вид со стороны малого желобка; е) – водные мостики в больших желобках i-мотива polyrC.

В структурах 3'E и 5'E топологий i-мотива polyrC BC между основаниями в C<sup>+</sup>-C парах сохранялись в течение всей траектории, что свидетельствует о стабильности этих структур. Кроме основных BC O2---HN4 и N3---HN3, между основаниями в парах наблюдались также бифуркационные BC O2---HN3 (рис. 7 с), но они были существенно менее стабильны. Между соседними остатками одной и той же цепи, как и в случае односпиральной polyrC, были зафиксированы бифуркационные BC с участием 2'-ОН гидроксильной группы рибозы: O5'---HO2' и O4'---HO2' (рис. 7 b). Причем, первые из них существовали в течение 80-70 % времени продукционной фазы траектории, тогда как вторые – в течение 40-30 %. Характерные для i-мотива по данным ЯМР спектроскопии [6] C1'H---O4' BC, соединяющие разные дуплексы через малые желобки, отсутствовали в течение большей части траектории. Так, в случае 3'E топологии наиболее стабильная из C1'H---O4' BC существовала лишь в течение 16 % времени продукционной фазы траектории, а в случае 5'E топологии – менее 2 %. Этот результат говорит о том, что СН---О BC все-таки не являются тем решающим фактором, который определяет стабильность i-мотива. В малых желобках i-мотива polyrC были обнаружены O2'---HO2' и O1P---HO2' BC, соединяющие сахарофосфатные остовы разных дуплексов i-мотива (рис. 7 d). А в больших желобках i-мотива polyrC для обеих топологий на протяжении всей траектории наблюдались водные мостики между атомами N4 и O2P разных дуплексов в согласии с данными ЯМР [6] (рис. 7 e).

### Конформационные переходы сахаров в polyrC

Анализ конформаций сахаров показал, что в процессе моделирования для polyrC наблюдаются переходы сахаров из C3'-endo в C2'-endo конформацию. На рис. 8 приведены полученные в результате моделирования распределения значений угла псевдowращения (P) для односпиральной и двух форм (3'E и 5'E) четырехспиральной polyrC. Видно, что, кроме ожидаемого максимума в области конформации C3'-endo (P = 30°), наблюдается также максимум в районе конформации C2'-endo (P = 170°). Подобные переходы сахаров из C3'-endo в C2'-endo конформацию были зафиксированы при моделировании i-мотива ДНК в работе Malliavin et al [19]. Автор объясняет этот эффект характерной особенностью силовых полей AMBER сдвигать фазовый угол псевдowращения сахаров в область C2'-endo конформации. Поскольку в данной работе также использовалось силовое поле AMBER, зафиксированный конформационный переход может быть всего лишь артефактом силового поля. Тем не менее, большинство сахарных остатков четырехспиральной polyrC в процессе моделирования находились в характерных для i-мотива C3'-endo и C4'-exo конформациях. Так, для средней структуры, полученной в результате моделирования для 5'E топологии, из 20 сахаров только 2 находились в конформации C2'-endo и 1 - в C1'-exo, а в случае 3'E топологии – 1 сахар в C2'-endo и 2 в C1'-exo конформации. Что касается односпиральной polyrC, то здесь, напротив, большинство сахаров перешли в нехарактерную для нее согласно данным PCA конформацию C2'-endo. Так, в средней структуре односпиральной polyrC только один сахар был в конформации C3'-endo и один в конформации O4'-endo, а остальные остатки находились в C2'-endo или C1'-exo конформациях.

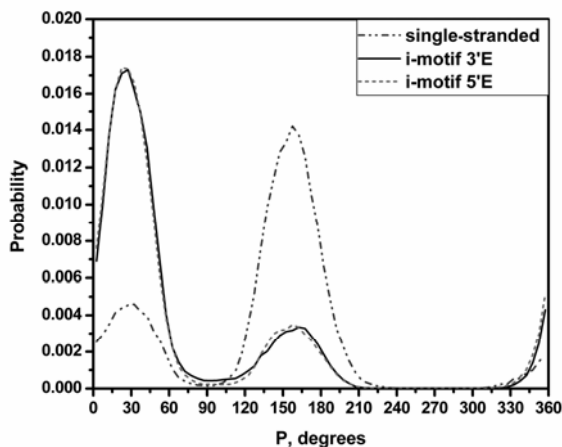


Рис. 8. Распределение значений угла псевдотворения ( $P$ ) для односпиральной polyrC и  $i$ -мотива polyrC, полученное из молекулярно-динамических траекторий.

## ВЫВОДЫ

Получены стабильные 5 нс молекулярно-динамические траектории для двух топологий 3'E и 5'E четырехспиральной polyrC  $[r(C_5)]_4$ . Водородные связи между основаниями в  $C^+$ -C парах сохранялись в течение всей траектории. Кроме того, в структуре  $i$ -мотива polyrC были зафиксированы ВС и водные мостики, соединяющие цепи, относящиеся к разным дуплексам. Характерные для  $i$ -мотива СН---О ВС в малых желобках отсутствовали в течение большей части траектории.

Двухспиральная форма polyrC  $[r(C_{10})]_2$  оказалась неустойчивой по данным молекулярно-динамического моделирования. Структура дуплекса, построенная по данным Лангриджа и Рича (helical rise = 3.11 Å, helical twist = 30°), разрушилась еще во время оптимизации. Альтернативная модель (helical rise = 3.11 Å, helical twist = 44°), полученная нами в результате поиска оптимального угла спирального вращения при том же самом расстоянии между парами, разрушилась во время фазы уравнивания системы: произошел разрыв водородных связей между основаниями в  $C^+$ -C парах и наблюдалось расхождение цепей дуплекса. Исходя из данных наших расчетов, можно сделать вывод, что если polyrC и существует в виде дуплекса, то его структура существенно отличается от исследованных нами моделей.

Структура односпиральной polyrC  $r(C_{10})$  претерпела значительные изменения в процессе моделирования: СКО относительно первого снимка траектории составило ~ 5 Å. Наблюдалось значительное нарушение стэкинга оснований. Возможно, к этому привело наличие большого числа внутримолекулярных ВС в структуре односпиральной polyrC.

В процессе моделирования были зафиксированы переходы сахаров из C3'-endo в C2'-endo конформацию. Причем, если в случае четырехспиральной polyrC большая часть сахаров все же осталась в C3'-endo и C4'-exo конформациях, то в случае односпиральной polyrC большинство сахарных остатков перешли в нехарактерную для нее C2'-endo конформацию. Возможно, наблюдаемый эффект является всего лишь артефактом силового поля, и для того, чтобы воспроизвести при моделировании кристаллографическую структуру односпиральной polyrC, необходимо использовать другое силовое поле или другой протокол моделирования с накладыванием дополнительных ограничений на конформации сахаров.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Sponer J. и Spackova N. за дополнительные параметры для протонированного цитозина для силового поля AMBER, Snoussi K. за предоставленную информацию об i-мотиве polyrC и Толсторукову М.Е. за полезное обсуждение результатов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. Москва: "МИР", 1987, С. 319-342.
2. Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A.G. // *J. Mol. Biol.* 1976. V.106. P.735-748.
3. Borah B., Wood J.L. // *J. Mol. Struct.* 1976. V.30. P.13-30.
4. Hartman K.A., Rich A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1965. V.87. P.2033-2039.
5. Langridge R., Rich A. // *Nature.* 1963. V.198. P.725-728.
6. Snoussi K., Nonin-Lecomte S., Leroy J.-L. // *J. Mol. Biol.* 2001. V.309. P.139-153.
7. Gehring K., Leroy J.-L., Gueron M. // *Nature.* 1993. V.363. P.561-564.
8. Manzini G., Yathindra N., Xodo L.E. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V.22. P.4634-4640.
9. Kang C.H., Berger I., Lockshin C., Ratliff R., Moyzis R., Rich A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V.92. P.3874-3878.
10. Lacroix L., Mergny J.-L., Leroy J.-L., Helene C. // *Biochemistry.* 1996 V.35. P.8715-8722.
11. Gueron M., Leroy J.-L. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. V.10. P.326-331.
12. Cai L., Chen L., Raghavan S., Ratliff R., Moyzis R., Rich A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V.26. P.4696-4705.
13. Kanaori K., Shibayama N., Gohda K., Tajma K., Makino K. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V.29. P.831-840.
14. Sponer J., Leszczynski J., Vetterl V., Hobza P. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1996. V.13. P.695-706.
15. Berger I., Egli M., Rich A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V.93. P.12116-12121.
16. Leroy J.-L., Snoussi K., Gueron M. // *Magn. Reson. Chem.* 2001. V.39. P.171-176.
17. Spackova N., Berger I., Egli M., Sponer J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V.120. P.6147-6151.
18. Gallego J., Golden E., Stanley D., Reid B. // *J. Mol. Biol.* 1999. V.285 P.1039-1052.
19. Malliavin T.E.; Gau, J.; Snoussi, K.; Leroy, J.-L. *Biophys J* 2003, 84, 3838-3847.
20. Mergny J.-L., Lacroix L., Han X., Leroy J.-L., Helene C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V.117. P.8887-8898.
21. Lacroix L., Mergny J.-L. // *Arch. Of Biochem. and Biophys.* 2000. V.381. P.153-163.
22. Krishnan-Ghosh Y., Stephens E., Balasubramanian S. // *Chem. Commun.* 2005. P.5278-5280.
23. Sharma N.K., Ganesh K.N. // *Chem. Commun.* 2005. P.4330-4332.
24. Kumar N., Nielsen J.T., Maiti S., Petersen M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V.46. P.9220-9222.
25. Modi S., Wani A.H., Krishnan Y. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V.34. P.4354-4363.
26. Chakraborty S., Modi S., Krishnan Y. // *Chem. Commun.* 2008. P.70-72.
27. Chakraborty S., Krishnan Y. // *Biochimie.* 2008. V.90. P.1088-1095.
28. Maleev V., Semenov M., Kashpur V., Bolbukh T., Shestopalova A., Anishchenko D. // *J. Mol. Struct.* 2002. V.605. P.51-61.
29. Petrovic A.G., Polavarapu P.L. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V.110. P.22826-22833.
30. Cohen B., Larson M.H., Kohler B. // *Chem. Phys.* 2008. V.350. P.165-174.
31. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Montgomery J.A. Jr., Vreven T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G.A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Gonzalez C., Pople J.A. GAUSSIAN-03, Revision A.1. Gaussian Inc. Pittsburgh. PA. 2003.

32. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M. Jr., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V.117. P.5179-5197.
33. Cieplak P., Cornell W.D., Bayly C., Kollman P.A. // *J. Comput. Chem.* 1995. V.16. P.1357-1377.
34. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. // *J. Comput. Chem.* 2000. V.21 P.1049-1074.
35. Dupradeau F.-Y., Pigache A., Zaffran T., Cieplak P. R.E.D. Version 2.0 User's Manual and Tutorial. Universite' de Picardie Jules Verne. Amiens. France. 2005.
36. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S.J., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. // *J. Comput. Chem.* 1993. V.14. P.1347-1363.
37. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E. III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Merz K.M., Wang B., Pearlman D.A., Crowley M., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Schafmeister C., Caldwell J.W., Ross W.S., Kollman P.A. AMBER 8. University of California. San Francisco. CA. 2004.
38. Tsui V., Case D.A. // *Biopolymers (Nucl. Acid Sci.)*. 2000. V.56 P.275-291.
39. Draper D.E., Misra V.K. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V.5. P.927-930.
40. Draper D.E. // *Biophys. J.* 2008. V.95. P.5489-5495
41. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J., Klein M.L. // *J. Chem. Phys.* 1983. V.79 P.926-935.
42. Darden T., York D., Pedersen L. // *J. Chem. Phys.* 1993. V.98, P.10089-10092.
43. Izaguirre J.A., Catarella D.P., Wozniak J.M., Skeel R.D. // *J. Chem. Phys.* 2001. V.114 P.2090-2098.
44. Lu X.-J., Olson W.K. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V.31. P.5108-5121.
45. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graphics.* 1996. V.14 P.33-38.