ІНСТИТУТ РАДІОФІЗИКИ ТА ЕЛЕКТРОНІКИ ІМ. О.Я.УСИКОВА НАН УКРАЇНИ

На правах рукопису

ЖИТНІКОВА Марія Юріївна

УДК 577.322

КОНФОРМАЦІЇ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ ДНК ТА БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВЕ ВПІЗНАВАННЯ

03.00.02 - біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата фізико-математичних наук

Науковий керівник

Шестопалова Ганна Вікторівна доктор фізико-математичних наук

Харків - 2016

		Зміст	
ПЕР	ЕЛІК УМ	ОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	5
BCT	УΠ		6
1	РОЗДІЛ	І: ПОЛІМОРФІЗМ ДНК І ПРОБЛЕМА БІЛКОВО-НУКЛЕЇ	НОВОГО
	ВПІЗНА	АВАННЯ	13
	1.1.	Поліморфізм ДНК	
	1.1.1.	Загальні відомості про структуру нуклеїнових кислот	13
	1.1.2.	Структурні критерії різних форм подвійної спіралі ДНК	17
	1.1.3.	Підтипи В-, А- і Z-форм подвійної спіралі ДНК	21
	1.1.4.	Деформації подвійної спіралі ДНК	25
	1.1.5.	Конформаційна динаміка ДНК і її роль у процесі білково-нуклеїно	ового
	ВГ	тізнавання	29
	1.2.	Комплекси ДНК-білки: специфічність і механізми впізнавання	
	1.2.1.	Загальні уявлення про специфічність білково-нуклеїнових компле	ксів
	i n	механізми білково-нуклеїнового впізнавання	30
	1.2.2.	Пряме білково-нуклеїнове впізнавання	33
	1.2.3.	Непряме білково-нуклеїнове впізнавання	35
	1.2.4.	Конформаційні перебудови цукрофосфатного остову фрагментів	ЦHК
	B	комплексах з білками і їх сиквенс-специфічність	
	1.2.5.	Вплив конформаційних перебудов подвійної спіралі ДНК на	
	пс	олярність і електростатичний потенціал жолобків	41
2	РОЗДІЛ	I: ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	46
	2.1.	Відбір структур для створення бази даних	
	2.2.	Вибір структур нуклеосом	
	2.3.	Розрахунок структурних параметрів ДНК	51
	2.4.	Визначення білково-нуклеїнових контактів	
	2.5.	Обчислення площ доступної поверхні атомів	
	2.6.	База даних ProtNA-ASA	
	2.7.	Розрахунок електростатичного потенціалу малого жолобка	
	2.7.1.	База даних кристалографічних структур вільної ДНК для розрахун	нку
	ел	ектростатичного потенціалу	56
	2.7.2.	Розрахунок електростатичного потенціалу малого жолобка	58
	2.7.2.	Розрахунок ширини малого жолобка	60
	2.8.	Розрахунок матриць подібності.	60

2

РОЗДІЈ	І: КОНФОРМАЦІЙНА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ
КОРОТ	ТКИХ ФРАГМЕНТІВ ВІЛЬНОЇ ДНК62
3.1.	Сиквенс-специфічні переходи торсійного кута у цукрофосфатного остову
коротки	их фрагментів вільної ДНК
3.2.	Площа доступної поверхні атомів коротких фрагментів ДНК у великому і
малому	у жолобках
3.2.1.	ПДП атомів коротких фрагментів ДНК і полярність жолобків
3.2.2.	ПДП атомів ОЗ', О5', С5' цукрофосфатного остову
3.3.	Обчислення і аналіз розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка
олігону	клеотидів вільної ДНК 70
3.3.1.	Загальний статистичний аналіз значень і розподілу електростатичного
П	отенціалу малого жолобка71
3.3.2.	Зміна електростатичного потенціалу малого жолобка в залежності від
к	онформації кута γ75
3.3.3.	Розподіл електростатичного потенціалу олігомерів в малому жолобку77
3.3.4.	Сиквенс-специфічність переходів кута ү
3.3.5.	Комплекси екзонуклеази ЕхоХ з двома сайтами зв'язування ДНК83
3.4.	Структурні перебудови цукрофосфатного остову ДНК і механізм непрямого
впізнав	ання
РОЗДІЈ	І: КОНФОРМАЦІЙНА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ
КОРОТ	^С КИХ ФРАГМЕНТІВ ДНК У КОМПЛЕКСАХ З БІЛКАМИ
4.1.	Альтернативні конформації цукрофосфатного остову ДНК в сайтах
зв'язува	ання з білками
4.1.1.	Комплекс рестриктази MspI з ДНК(PDB id 1SA3)90
4.1.2.	Комплекс BPV-1 E2 з ДНК (PDB id 2BOP)91
4.1.3.	Комплекс Heterodimeric Ecdysone Receptor 3 ДНК (PDB id 1R0O)92
4.1.4.	Комплекс ДНКази I з ДНК (PDB id 1DNK)93
4.1.5.	Комплекс Zif268 з ДНК (PDB id 1AAY)94
4.2.	Сиквенс-специфічні переходи торсійного кута у цукрофосфатного остову у
білково	-нуклеїнових комплексах
4.3.	Площа доступної поверхні атомів у білково-нуклеїнових комплексах.
Полярн	ість жолобків зв'язаної ДНК
4.4.	ПДП атомів ОЗ', О5' і С5' у малому і великому жолобках 103
4.5.	Аналіз білково-нуклеїнових контактів106

	4.6.	Роль	альте	ернативни	к кон	іформаці	й ц	укроф	осфа	гного	OCTOR	sy i	в	білково-
	нуклеїн	ювому	впізн	аванні				•••••		•••••	•••••		•••••	111
	4.6.1.	Ком	плек	с рестрикі	ційної	ендонук.	леаз	и Ecol	RV 3 ,	ДНК (PDB ic	1 1 S	X5)115
	4.6.2.	Ком	плек	с рестрикі	ційної	ендонук.	леаз	и Thal	і з ДН	K ((PI	DB id 3	3ND	H)	117
	4.6.3.	Ком	плек	с рестрикі	(ійної	ендонук	леаз	и Pvul	II з ДІ	HK(PE	OB id 3	PVI)	118
5	РОЗДІ.	Л:	СИК	ВЕНС-СП	ЕЦИФ	ЧНІСТІ	5	Ι	XA	РАКТ	EP	PC	33 1	юділу
	АЛЬТЕ	EPHATI	ИВНИ	Х КОНФ	OPMA	ЦІЙ КУ	ГΙВ	α⁄γЦ	УКРС)ФОС	ΦΑΤΗ	ОГС	0 0	СТОВУ
	НУКЛІ	EOCOM	1HOÏ ,	днк	•••••								•••••	121
	5.1.	Рівні і	компа	ктизации	ДНК в	в клітині	і стр	уктур	а нук.	пеосом	4	•••••		121
	5.2.	Самос	ргані	зація нукл	еосом	. .		•••••		•••••	•••••	•••••		123
	5.3.	Особл	ивост	ті конформ	ації ц	укрофос	фатн	ого ос	тову	нукле	осомно	ої ДІ	ΗК	125
	5.4.	Часто	га ви	явлення і	сиквен	нс-специ	фічн	ість к	офно	рмації	йних г	iepez	ход	ців кутів
	α/γ нук	леосом	ної Д	НК		•••••		•••••		•••••	•••••	•••••		126
	5.5.	ПДП а	атомін	в нуклеосс	мної Д	ЦНК. Пол	пярн	ість ж	олобн	сів нук	леосо	мноі	iД	НК.128
	5.6.	Харак	тер	розподілу	и нун	клеотидіі	33	аль	терна	тивни	МИ К	сонф	pop	маціями
	цукроф	осфатн	ого о	стову нукл	еосом	пної ДНК		•••••		•••••	•••••	•••••	•••••	131
ВИСН	ОВКИ.		•••••		•••••		•••••	•••••	•••••			•••••	•••••	121
СПИС	ОК ВИ	КОРИС	СТАН	ИХ ДЖЕН	ΈЛ			•••••	•••••	•••••		•••••	•••••	143
дода	ТКИ.		•••••		••••••			•••••	•••••	•••••		•••••		158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

НК	Нуклеїнова кислота
ДНК	Дезоксірибонуклеїнова кислота
РНК	Рибонуклеїнова кислота
A	Аденін
С	Цитозин
Т	Тимін
G	Гуанін
U	Урацил
Н-зв'язки	Водневі зв'язки
PCA	Рентгеноструктурний аналіз
R	Пурин
Y	Піримідин
ПДП	Площа доступної поверхні
П.о.	Пара основ

ВСТУП

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Поліморфізм ДНК і здатність її подвійної спіралі до змін при утворенні комплексів з білками – проблема, що має безпосереднє біологічне значення, оскільки білково-нуклеїнове впізнавання використовується білками на всіх етапах реалізації генетичної інформації. При її вирішенні виникає необхідність оцінки конформаційної рухливості, властивої для структури ДНК, і порівняння з даними про перебудови подвійної спіралі ДНК, які індуковані взаємодією з білками. На даний час відомо, що структура подвійної спіралі ДНК при комплексоутворенні з різними біологічно значущими молекулами в цілому зберігається. При цьому для коротких фрагментів ДНК виявлена істотна варіабельність, яка призводить до утворення різних конформаційних станів, що мають високу сиквенс-специфічність (залежність від послідовності нуклеотидів у ланцюзі ДНК). Однак, до сих пір немає повного розуміння, чи є структурний поліморфізм подвійної спіралі ДНК властивістю, що притаманна її конкретним послідовностям, чи стимулюється взаємодією з білками. Необхідність детального дослідження механізмів конформаційної мінливості ДНК при утворенні комплексів з білками диктується також тим, що поки не вдається сформулювати універсальні правила сиквенс-специфічного білково-нуклеїнового впізнавання, аналогічні принципу комплементарності, який керує процесом формування подвійної спіралі ЛНК. He з'ясовано також можливий взаємозв'язок між структурними перебудовами подвійної спіралі і зміною її фізичних характеристик, що можуть залежати від послідовності і, отже, бути сигналами до впізнавання білками своїх сайтів зв'язування на ДНК при формуванні комплексів.

Вивчення процесів специфічного білково-нуклеїнового комплексоутворення припускає використання як традиційних, так і сучасних методів біохімії, молекулярної біології і біофізики. Особливе місце в цьому ряду займають методи біоінформатики, що дозволяють проводити різнобічний аналіз баз даних, які містять інформацію про атомну структуру фрагментів ДНК, білків і їх комплексів. Наприклад, статистичний аналіз таких баз даних дозволяє встановлювати

закономірності конформаційних перебудов біополімерів для визначення їх ролі при реалізації сиквенс-специфічних білково-нуклеїнових контактів. У зв'язку з цим актуальним завданням стає аналіз PDB і NDB баз даних, що містять структури фрагментів ДНК різного нуклеотидного складу та білково-нуклеїнових комплексів, який дозволить загальні закономірності визначити ЯК конформаційного поліморфізму ДНК, так і механізмів білково-нуклеїнового впізнавання. Визначення площ доступної поверхні атомів, полярності жолобків і обчислення значень електростатичного потенціалу для фрагментів вільної ДНК і ДНК у комплексах з білками дає можливість встановити зв'язок між конформаційними перебудовами олігонуклеотидів і їх фізичними властивостями, в тому числі сиквенс-специфічність змін, що спостерігаються. Актуальність таких досліджень визначається також тим, що опанування загальних принципів молекулярного впізнавання на прикладі з'ясування механізмів специфічного білково-нуклеїнового комплексоутворення є підґрунтям для вирішення деяких задач нанотехнологій, в основі яких лежить здатність до самоорганізації молекул та наночасток з визначеною ієрархією «from bottom to up», тобто «від низу до верху», для створення наноструктур та нанопристроїв.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проводились згідно з планом науково-дослідних робіт відділу біофізики Інституту радіофізики та електроніки імені О. Я. Усикова НАН України в рамках фундаментальних держбюджетних НДР: «Молекулярні моделі комплексів біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами за умовами мультимодального та конкурентного зв'язування» (шифр «Модель», номер держреєстрації 0107U001079); «Механізми впливу біологічно-активних речовин і електромагнітних полів гіга- та терагерцевого діапазонів на біооб'єкти різного рівню організації (біополімери, біомембрани, клітини)» (шифр «Модель-2», номер держреєстрації 0111U010475).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було визначення впливу конформаційних перебудов цукрофосфатного остову ДНК на структурні та фізичні характеристики подвійної спіралі і їх можливу сиквенс-специфічність за

результатами аналізу структурних баз даних для встановлення їх ролі в реалізації непрямого механізму білково-нуклеїнового впізнавання.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити *такі основні* задачі:

(1) Створити оригінальну базу даних, яка міститиме інформацію про конформаційні параметри фрагментів вільної ДНК, ДНК в комплексах з білками, відомості про площі доступної поверхні атомів ДНК, електростатичний потенціал малого жолобка, білково-нуклеїнові контакти.

(2) На основі аналізу структурних PDB і NDB баз даних визначити:

- тип і кількість структурних перебудов цукрофосфатного остову вільної ДНК і ДНК в комплексах з білками;

- зміну площ доступної поверхні атомів, які формують жолобки подвійної спіралі при конформаційних перебудовах цукрофосфатного остову;

- кількість білково-нуклеїнових контактів у комплексах.

(3) Визначити і проаналізувати фізичні характеристики вільної ДНК і ДНК в комплексах з білками, а саме:

- величину і розподіл електростатичного потенціалу малого жолобка олігонуклеотидів вільної ДНК;

- полярність жолобків подвійної спіралі вільної ДНК і в комплексах з білками.

(4) Встановити сиквенс-специфічність структурних перебудов цукрофосфатного остову і фізичних характеристик вільної ДНК і ДНК в комплексах з білками.

(5) На прикладах конкретних структур, доступних у PDB i NDB базах даних, проаналізувати спостережувані перебудови цукрофосфатного остову, пов'язані з ними зміни фізичних властивостей ДНК та формування певних типів білковонуклеїнових контактів у сайтах зв'язування.

(6) Визначити особливості конформації цукрофосфатного остову ДНК у складі нуклеосом і розподіл нуклеотидів зі зміненим структурним станом вздовж послідовності нуклеосомної ДНК.

Об'єкт дослідження – механізми непрямого білково-нуклеїнового впізнавання.

Предмет дослідження – структурні та фізичні характеристики цукрофосфатного остову і жолобків вільної ДНК, ДНК в комплексах з білками і у складі нуклеосом.

Методи дослідження – статистичний аналіз структурних баз даних, методи комп'ютерного експерименту.

Наукова новизна отриманих результатів.

 За допомогою статистичного аналізу кристалографічних структур коротких фрагментів вільної ДНК вперше встановлені закономірності переходів кута у цукрофосфатного остову в альтернативні конформації для В- і А-ДНК і встановлена їх сиквенс-специфічність.

2. Аналіз значень електростатичного потенціалу коротких фрагментів вільної ДНК вперше дозволив встановити кореляцію між послідовністю ДНК, структурним станом цукрофосфатного остову, шириною малого жолобка, величиною і розподілом його електростатичного потенціалу. Показано, що розподіл електростатичного потенціалу малого жолобка є сиквенс-специфічним.

3. Для ДНК в комплексах з білками вперше визначено кількість і сиквенсспецифічність перемикань кута γ та кількість контактів між білками і нуклеотидами, що мають альтернативні конформації кута γ і/або відрізняються конформацією дезоксирибози, і їх розподіл по жолобках.

4. Аналіз полярних властивостей ДНК в комплексах з білками показав, що нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ змінюють площу доступної поверхні полярних і неполярних атомів, експонованих у жолобки, зокрема, атомів O3', O5' і C5' цукрофосфатного остову, і, як наслідок, полярність обох жолобків. Показано також, що полярно/гідрофобний профіль нуклеотидів, що мають будьяку конформацію кута γ, є сиквенс-специфічним.

5. При дослідженні структури цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК вперше виявлені «консервативні» позиції нуклеотидів з альтернативними конформаціями кутів α/γ. Такі положення нуклеотидів можуть бути наслідком

згортання ДНК в суперспіраль, що накладає певні обмеження на конформацію цукрофосфатного остову.

6. ДНК у складі нуклеосом вперше виявлено високий вміст Лля нуклеотидів конформаціями 3 альтернативними які кута γ, можуть розташовуватися або на зовнішній поверхні нуклеосоми у сайтах вигину ДНК у жолобки, або рівномірно розподілятися як на зовнішній, так і на внутрішній поверхні ДНК, зверненої до гістонового кору. Такі конформаційні перемикання кута у необхідні як для точного позиціонування нуклеосом, що забезпечує їх стабільність, так і для впізнавання білками конкретних сайтів зв'язування на ДНК.

Практичне значення отриманих результатів.

Створено оригінальну базу даних, вільно доступну в Інтернеті (<u>www.protna.bio-page.org</u>), яка містить інформацію про конформаційні параметри фрагментів вільної ДНК, ДНК в комплексах з білками, відомості про площі доступної поверхні атомів ДНК, електростатичний потенціал малого жолобка, кількість білково-нуклеїнових контактів. Статистика відвідувань бази даних в Інтернеті: 3392 загальних звертань (612 унікальних *ip* адрес), з яких 291 за період з 1 січня по 5 листопада 2016.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз наукової літератури, створено власну вільно доступну в Інтернеті базу даних, отримано результати статистичного аналізу структурних баз даних, розраховано площі доступної поверхні, кількість білково-нуклеїнових контактів, значення та форму розподілу електростатичного потенціалу, візуалізовано та проаналізовано велику кількість структур з баз даних для верифікації усіх отриманих результатів. Автором особисто виконано первинний аналіз результатів і сформульовано попередні висновки. Разом з науковим керівником, д.ф.-м.н. Шестопаловою Г.В., були визначені мета, задачі роботи і способи їх вирішення, здійснено інтерпретацію отриманих результатів та зроблено остаточні висновки. В опублікованих спільно зі співавторами працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [1,8,9] – безпосереднє створення бази даних та наповнення її фактичними

даними; у роботах [2,3] – підбір і аналіз літератури, проведення необхідних розрахунків та систематизація їх результатів, візуалізація проаналізованих структур, участь у написанні оглядів; у роботах [4,10,11] – проведення розрахунків площі доступної поверхні, обговорення результатів, участь у написанні статей та тез; у роботах [5,12,14,17,18] – створення бази даних нуклеосом, проведення статистичного аналізу отриманих даних, обговорення результатів, участь у написанні статей та тез; у роботах [6,21,22] – розрахунок електростатичного потенціалу малого жолобка, аналіз та візуалізація отриманих даних, участь у написанні статей та тез; у роботах [6,21,22] – розрахунок електростатичного потенціалу малого жолобка, аналіз та візуалізація отриманих даних, участь у написанні статей та тез; у роботах [7,13,15,16,19,20] – проведення необхідних розрахунків, участь у написанні тез. Постановка задачі та інтерпретація отриманих даних здійснювалися спільно з науковим керівником та співавторами наукових публікацій.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на таких міжнародних та вітчизняних конференціях: NATO advanced Research Workshop "Molecular Self-Organization in Micro-, Nano And Macro Dimensions: From Molecules to Water, to Nanoparticles, DNA and Proteins", Kviv (Ukraine), 2008; VIII-th i IX-th Kharkov Young Scientist Conferences "Radiophysics and Electronics, Biophysics", Kharkov (Ukraine), 2008, 2009; V, VI и VII Международная научно-техническая конференция "Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии", Севастополь (Украина), 2009, 2010, 2011; 2 Всеукраинская научная конференция молодых ученых "Физика низких температур КМВ-ФНТ-2009", Харьков (Украина), 2009; XII Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI Века», Пущино (Россия), 2009; 4th ESF Conference on Functional Genomics & Disease, Dresden (Germany), 2010; V з'їзд Українського біофізичного Луцьк (Україна), 2011; II, III, IV International Conferences товариства, "Nanobiophysics: fundamental and applied aspects", Kiev (Ukraine), 2011, 2013, 2015; International Conference "Problems of Theoretical Physics", Kyiv (Ukraine), 2012; V International Conference Low Temperature Physics (ICYS-LTP-2014), Kharkov (Ukraine), 2014.

Публікації. Основні результати дисертації опубліковано у 22 наукових працях; з них: 1 монографія, 1 розділ у міжнародній монографії, 4 статі у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах та 16 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, висновків, переліку використаних літературних джерел та додатків. Повний обсяг дисертації складає 164 сторінки, дисертація містить 50 рисунків, 26 таблиць, 4 з яких займають окремі сторінки, 11 додатків (8 таблиць та 3 рисунки), які займають 7 сторінок. Список використаних джерел складається з 235 найменувань та займає 15 сторінок.

РОЗДІЛ 1 ПОЛІМОРФІЗМ ДНК І ПРОБЛЕМА БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВОГО ВПІЗНАВАННЯ

1.1. Поліморфізм ДНК

1.1.1. Загальні відомості про структуру нуклеїнових кислот

Нуклеїнові кислоти (НК) беруть участь в основних процесах життєдіяльності живих організмів на молекулярному рівні: зберіганні, передачі і відтворенні інформації. спалкової Функціонування ΗК відбувається завляки ïχ конформаційній рухливості і залежить від різних факторів, до яких відносяться склад і послідовність мономерів полімерного ланцюга НК, тип і концентрація протиіонів, взаємодія з розчинником – водою [1,2]. НК бувають двох основних видів – ДНК і РНК. Молекули ДНК містять генетичний код і виконують функцію зберігання спадкової інформації. Більш мобільні молекули РНК беруть участь у процесах передачі і регуляції такої інформації, як транскрипція і трансляція генетичного коду.

Молекули НК – це полімери, кожний ланцюг яких є лінійною послідовністю хімічно позв'язаних мономерів – нуклеотидів. Нуклеотид ДНК (РНК) складається з трьох основних частин (рис.1): гетероциклічного з'єднання – азотистої основи (пуринові похідні гуанін (G) і аденін (A) і піримідинові похідні – цитозин (C), тимін (T) у ДНК і урацил (U) у РНК), моносахариду (дезоксирибози у ДНК і рибози у РНК) і залишку фосфорної кислоти. Послідовність нуклеотидів, яка утворюється за допомогою фосфодіефірних зв'язків між 5'-фосфатом одного нуклеотиду і 3'-гідроксидною групою моносахарида наступного нуклеотиду, визначає первинну структуру ДНК і РНК (рис.1.1).

Експериментальні дані про склад і фізико-хімічні властивості ДНК вдалося інтерпретувати Уотсону і Крику [3], які запропонували модель подвійної спіралі з комплементарними ланцюгами, яка представляє просторову, або вторинну структуру ДНК (рис.1.1б). Вони сформулювали основні риси моделі подвійної спіралі ДНК. Повний виток спіралі включає 10 пар основ, крок спіралі складає величину 34,0 Å, кут повороту пари основ по відношенню до сусідньої

дорівнює 36° (кут спірального обертання), діаметр подвійної спіралі ~ 20 Å. Така модель ДНК відповідає ідеальній В-формі подвійної спіралі.





Рисунок 1.1. (а) Хімічна структура послідовності ДНК [... ТАСС ...] в напрямку від 5' до 3'-кінця; на вставці показані дві основні хімічні відмінності ДНК від РНК, відмічені стрілками: (1) азотиста основа ДНК тимін (Т) у РНК замінюється урацилом (U), в якому відсутня метильна група в положенні 5; (2) гідроксильна група в положенні 2' у цукровому кільці молекул РНК заміщена атомом водню у молекулі ДНК; (б) фрагмент подвійної спіралі ДНК; (в) комплементарні пари ДНК А-Т і G-C; водневі (Н-) зв'язки показані пунктиром.

Між поверхнями двох ланцюгів спіралі, що формують її цукрофосфатний остов, утворюються жолобки – великий і малий (рис.1.16, 1.1в).

Перші дослідження волокон ДНК з використанням методу рентгеноструктурного аналізу (РСА) [4,5], показали, що просторова структура ДНК залежить від вмісту води в досліджуваному зразку. При високих значеннях вологості (більше 86%) за фізіологічних умов (0,2 М – молярна концентрація іонів Na⁺) подвійна спіраль має В-форму. При відносній вологості близько 72% утворюється А-форма подвійної спіралі ДНК. Тому подвійна ДНК спіраль поліморфна, і вона утворює, принаймні, дві основні конформації (рис.1.2a, б).



Рисунок 1.2. Три основні форми подвійної спіралі ДНК: (а) А-ДНК, (б) В-ДНК, (в) Z-ДНК.

У 1979 р. була опублікована перша детальна структура кристала ДНК – гексамера d(CGCGCG)₂ [6], подвійна спіраль якого відрізнялась від канонічних A- і B-форм ДНК і представляла собою звивисту ліву спіраль, названу Z-формою ДНК. Ця форма подвійної спіралі утворюється при певному нуклеотидному складі – послідовності, в якій чергуються основи гуанін і цитозин і високому вмісті іонів Na⁺ або Mg²⁺ (рис.2в).

Одночасно були отримані кристали олігомерів, які відрізнялися нуклеотидним складом і відповідали А-формі (d(GGTATACC)₂) [7,8] і В-формі ДНК (d(CGCGAATTCGCG)₂) [9,10]. Додекамер d(CGCGAATTCGCG)₂ – місце зв'язування рестрикційного фактору EcoRI – став зручним об'єктом для вивчення сиквенс-специфічності (залежності від послідовності) параметрів подвійної спіралі ДНК. Були досліджені 22 варіанта цього фрагмента [11], що відрізняються умовами кристалізації, на підставі яких зроблено висновки щодо сиквенс-специфічності геометрії подвійної спіралі, наприклад, ширина малого жолобка і вигин осі спіралі ДНК залежать від нуклеотидного складу.

При зміні зовнішніх умов між різними формами ДНК відбуваються конформаційні переходи (А \leftrightarrow B, B \leftrightarrow Z), які мають як кооперативну, так і некооперативну природу. Кооперативність у разі А \leftrightarrow B переходу пов'язана зі зміною конформації дезоксирибози: СЗ'-ендо – (А-форма) \leftrightarrow С2'-ендо – (В-форма) (рис.1.3).



Рисунок 1.3. Компоненти і структура цукрофосфатного остову: (а) дезоксирибоза і її СЗ'-ендо- та С2'-ендо-конформації; (б) система нумерації атомів і визначення торсійних кутів.

При цьому можливе існування кордону розділу конформацій для неоднорідних по первинній структурі ДНК, (наприклад, «А-В стик»), який призводить до вигину подвійної спіралі ДНК. Такі порушення однорідності просторової структури подвійної спіралі полегшують процеси суперспіралізації ДНК при формуванні нуклеосом і можуть бути структурним «сигналом» при «впізнаванні» білками свого сайту зв'язування [12].

У вільній ДНК послідовність (dA) • (dT) (А-тракти), утворює за різних умов – у волокнах, кристалах і в розчині – подвійну спіраль [9,13,14], яка отримала назву В'-форми [15]. Крім А-трактів перехід у В'-форму спостерігається і у відносно коротких АТ-послідовностей, наприклад, у АТ кроків [16]. Перехід у В'-форму ТА і СG кроків має енергетичний бар'єр, який може бути подоланий при утворенні комплексів з білками [17].

В'-форма, в порівнянні з канонічною В-ДНК, має відмінні риси: (1) вузький малий жолобок [16,18,19]; (2) водний «хребет» [20,21] і високоупорядковану

гідратацію малого жолобка [22]; (3) схильність до вигину ДНК [23]; (4) присутність одновалентних катіонів у малому жолобку [22]; (5) негативні значення Propeller і Twist (відхилення від планарного розташування основ у парі – обертання навколо осі у) [24]; (6) висока конформаційна і деформаційна жорсткість [25,26].

1.1.2. Структурні критерії різних форм подвійної спіралі ДНК

Одне з найважливіших питань, що має особливу біологічну значимість, – як конформаційна мінливість ДНК на локальному рівні (орієнтація пар основ, конфігурація окремих «кроків» подвійної спіралі – динуклеотидів, конформація цукрофосфатного остову) впливає на глобальну структуру молекули ДНК і на її взаємодії з білками [27]. Тому необхідно мати критерії, за допомогою яких можна встановити, чи спостерігаються конформаційні перебудови у вільній ДНК і у процесі утворення білково-нуклеїнових комплексів і які саме.

Структурні відмінності між А-, В- і Z-формами подвійної спіралі ДНК, отримані з РСА волокон, характеризуються рядом конформаційних параметрів [15,28,29-33]. До них відносяться: параметри спіралі (кут спірального обертання між двома сусідніми залишками, Twist; відстань між нуклеотидами вздовж осі спіралі, Rise; крок спіралі, axial rise; кут нахилу пари, Tilt), зміщення пар основ щодо осі спіралі (x-displacement), ширина і глибина жолобків, віртуальні ланцюгові відстані (dpp, dC1'C1') (таблиця 1.1), фазовий кут псевдообертання цукрового кільця (P) і конформація дезоксирибози.

За даними РСА волокон ДНК було встановлено, що основними критеріями для віднесення структури ДНК до А- або В-форми подвійної спіралі є конформація дезоксирибози [34,38], спіральні параметри Rise i Twist [28], ширина і глибина жолобків [35]. Очевидно, що значення цих параметрів взаємопов'язані один з одним. Так, відмінностями в конформації дезоксирибози у ДНК в А- і В-формі обумовлені варіації відстаней між атомами фосфору сусідніх фосфатних груп одного полінуклеотидного ланцюга (таблиця 1.1, dpp). Тому спіралі А- і В-типу закручені по-різному, що відповідає різним кутам спірального обертання (Twist).

Таблиця 1.1

Структурні параметри А- і В-ДНК для волокон і кристалічних структур ДНК (дані РСА) [28,30,32,34-37].

Форма подвійної спіралі	А-ДНК		В-ДНК	
Стан ДНК	Волокна	Кристали	Волокна	Кристали
Параметри спіралі				
Кут спірального обертання (helical twist,°)	32,7 ±1,2	32,5	36,0	36,5
Зсув п.о. вздовж осі (axial rise, z, Å)	2,55	2,8	3,4	3,3
Висота на виток (Rise, Å)	28,8	-	35,6	-
Зсув від осі спіралі (x-displacement, Å)	$4,4 \div 4,9$	4,2	-0,14	-0,2
Кут нахилу пари (Tilt,°)	20,0	-	-5,9	-
Pe	озміри жоло	бків (Å)		
Великий жолобок	$8,0 \pm 2,7$	12,9±2,6	$17,2\pm 0,1$	17,4
Малий жолобок (ширина)	$16,7\pm 0,1$	$15,8\pm0,5$	$12,1\pm 0,4$	10,8
Великий жолобок	$13,0 \pm 0,5$	-	8,5	-
Малий жолобок (глибина)	2,6 ± 0,2	-	7,5	-
Орієнтація пар основ				I
TBict (Twist, ^o)	30,3	31,1	36,0	36,0
Ролл (Roll, [°])	12,4	8,0	0,6	1,7
Слайд (Slide,Å)	-1,4	-1,53	0,45	0,23
Тилт (base-pair Tilt,°)	22,6	14,6	2,8	2,1
Віртуальн	і міжланцюг	ові відстані (Å)	
d _{pp}	5,5	6,0	6,6	6,7
d _{C1′C1′}	5,4	5,5	4,9	4,9
Поло	ження фосф	атів (Å)		
X _p	-0,9	-1,7	-3,0	-3,0
, V _p	8,4	8,5	8,9	8,9
Z_p	2,5	2,2	-0,6	-0,4



Рисунок 1.4. Локальні параметри подвійної спіралі ДНК [42]: (а) шість параметрів, що описують конформацію пари основ; (б) шість параметрів, що описують конформацію динуклеотидного кроку; основи показані з боку малого жолобка.

Значення кута нахилу пари (Tilt) також істотно відрізняється для спіралей А- і Втипу і, отже, корелює з конформацією дезоксирибози (С2'-ендо- у В-форми і С3'ендо- або еквівалентна їй С3'-екзо- у А- форми) [28].

Крім того, А- і В-форми ДНК розрізняються за величиною зміщення пари основ від осі спіралі (x-displacement). У В-ДНК ось спіралі проходить через пару основ (x-displacement ~ -0,2 Å). В А-ДНК через велике зміщення пар щодо осі (x-displacement -4,4 ÷ -4,9Å) полінуклеотидні ланцюги обвивають вісь, утворюючи всередині порожній циліндр. Пари основ розташовані по периферії спіралі, що призводить до утворення глибокого вузького великого жолобка і мілкого широкого малого жолобка. У В-ДНК жолобки менш виражені, їх глибина приблизно однакова, але ширина різниться: великий жолобок ширше малого (таблиця 1.1).

Конформації цукрофосфатного остову описуються за допомогою можливих змін залишків дезоксирибози і торсійних кутів полінуклеотидних ланцюгів (рис. 1.3). Аналіз структури нуклеотидів показав, що залишки дезоксирибози знаходяться в одній з двох найбільш ймовірних конформацій: C2'-ендо- з 0° <P <36° (South, B-форма) і C3'-ендо- з 144° <P <190° (North, A-форма) (рис.1.3) [28]. Перемикання цукру з C3'-ендо- в C2'-ендо- конформації супроводжується зміною положення нуклеотиду щодо дезоксирибози. У результаті цього доступність гідрофобних атомів для утворення контактів з білками у A-ДНК і B-ДНК різниться [39].

Аналіз кристалів ДНК методом РСА з високою роздільною здатністю дозволив визначити більш тонкі риси А- і В-форм подвійної спіралі [40]. На рівні окремих динуклеотидних кроків, описаних набором локальних параметрів (рис.1.4, [41,42]), структура ДНК виявилася нерегулярною, істотно залежною від нуклеотидної послідовності і на кожному конкретному кроці подвійна спіраль має характеристики, що відрізняються від середніх значень для канонічних А- і В форм.

Найбільші відмінності у А- і В-форм при статистичному аналізі їх кристалічних структур були виявлені для параметрів Slide і Roll: у А-ДНК Slide - 1,57 ($\pm 0,38$) Å, Roll 7,9 ($\pm 5,6$)°; у В-ДНК Slide 0,21 ($\pm 0,74$) Å, Roll -0,2 ($\pm 5,7$)° [43,

44]. Тобто, В→А перехід супроводжується розкручуванням пар основ, збільшенням Roll і зменшенням Slide.

Перехід з В-форми в А-форму можливий при одночасній зміні Slide і Roll: зміщенням пар основ на 1,5Å (Slide) і їх обертанням на 12° (Roll) [43]. В якості додаткового дискримінаційного фактору при віднесенні динуклеотидів до А- або В-типу було запропоновано використовувати середню відстань уздовж осі z між атомами фосфору сусідніх нуклеотидів – Zp (таблиця 1.1): Zp> 1,5 Å у А-ДНК і Zp <0,5Å у В-ДНК [45,46]. При цьому величина Zp корелює зі значенням кута χ : коефіцієнт кореляції порядку -1,0.

Крім того, «А-фільні» (або «А-подібні») динуклеотидні кроки (GG/ CC, GT/AC), у тому числі і в складі В-ДНК, можуть мати спіральні параметри, характерні для А-ДНК: негативний Slide, позитивне Zp, більше значення Roll і меньше – Twist. «А-фобні» (або «В-подібні») динуклеотидні кроки (AA/TT і GA/TC) мають значення цих же параметрів, характерні для В-форми [27].

Стекінг (вертикальні взаємодії між основами нуклеотидів вздовж ланцюга) у А- і В-ДНК також різниться. У подвійних спіралях В-типу стекінг обмежений взаємодіями між основами одного полінуклеотидного ланцюга (внутрішньо ланцюговий стекінг). В А-спіралях ДНК у стекінгу беруть участь і основи, що належать різним ланцюгах, тобто має місце як внутрішньо-, так і міжланцюговий стекінг. Це обумовлено двома причинами [28]: (1) кут між сусідніми нуклеотидами (Twist) у спіралях А-типу менше (30 - 32,7°), ніж у спіралях В-типу (36 - 45°), що сприяє утворенню обох видів стекінгу; (2) нахил пар (Tilt), позитивний у спіралях А-типу і негативний у спіралях В-типу, призводить до збільшення перекривання пар у першому випадку і зменшення - у другому.

Конформація цукрофосфатного остову подвійної спіралі в напрямку $P \rightarrow O5' \rightarrow C5' \rightarrow C4'$ описується шістьма торсійними кутами α , β , γ , δ , ε , ζ ; п'ятьма ендоциклічними торсійними кутами цукру $v_0 \div v_4$ і кутом χ , який визначає орієнтацію основ щодо цукрового кільця (рис.1.36). Величини торсійних кутів, що змінюються в діапазоні $180^\circ + 60^\circ (120^\circ \div 240^\circ)$, прийнято позначати як trans (*t*) конформації; в межах $60^\circ \pm 60^\circ (0^\circ \div 120^\circ)$ і $300^\circ \pm 60^\circ (240^\circ \div 360^\circ)$ як gauche+ (*g*+) і gauche- (*g*-) конформації, відповідно (рис.1.36). Для А- і В-форм ДНК методом РСА визначені середні значення всіх торсійних кутів (таблиця 1.2), порівняння яких показало, що не можна виділити якийсь один кут, величина якого була б критерієм А- або В-форми. При аналізі істотних відхилень величин торсійних кутів, виявлених у динуклеотидних кроків додекамеру d(CGCGAATTCGCG)₂ [24], було висловлено припущення, що джерелом високої конформаційної гнучкості В-форми ДНК можуть бути обертання навколо зв'язків O3'P-O5'C5 '(кут α) і C3'O3'-PO5' (кут ζ). Однак виявилося, якщо кут ζ істотно відрізняється для динуклеотидних кроків (311°÷170°), то кут α змінюється в межах *g*- конформації (319°÷280°) [47].

Таблиця 1.

	-	•			1 1	, ,	
Форма ДНК кути	α	β	γ	δ	3	ζ	χ
А-ДНК ^а	308 ± 2	175 ± 3	42 ± 1	79± 1	212 ± 2	305 ± 2	203 ± 1
А-ДНК ^б	293±17	174 ± 14	56 ± 14	81 ± 7	$203 \pm$	$289 \pm$	199 ± 8
В-ДНК ^в	314	213	36	157	155	264	262
В- ДНК ^г	299 ± 8	180 ± 14	57 ± 8	$122 \pm$	177 ±	269 ±	241 ± 14
В-ДНК ^д	298 ± 15	176 ± 9	48 ± 11	128 ±	184 ±	265 ±	241 ± 8

Значення торсійних кутів (град.) для А- і В-форм ДНК

^а- [29], ^в-[30] – дані для волокон ДНК; ^{б, г} - [47], ^д – [24] – дані для кристалів ДНК.

Пропонувалися комбінації двох кутів, які могли б бути характерними для однієї з форм подвійної спіралі. У В-ДНК значущі кореляції виявили для пар χ -δ, χ - ζ , δ- ζ , ε- ζ , ε- β i ζ - β [47], а у А-ДНК - для пар χ -δ, χ -ε, χ - α , ε- α , ζ - α , ζ - γ , α - β i α - γ [38]. При цьому значення пари кутів χ і δ корелюють з конформацією дезоксирибози і можуть бути рекомендовані як критерії А- або В-ДНК [48-50].

1.1.3. Підтипи В-, А- і Z-форм подвійної спіралі ДНК

Як видно з результатів, представлених у таблиці 1.2, кути β і γ цукрофосфатного остову в А- і В-формах незначно відрізняються між собою, залишаючись у (*t*, *g*+) конформаціях, відповідно. При цьому більша варіабельність зафіксована для кута β (PO5'-C5'C4'), значення якого корелює з величинами кутів є і ζ уздовж ланцюга. Кут δ , пов'язаний з конформацією дезоксирибози, проявляє

найбільшу мінливість, а пара кутів є і ζ варіює в рамках двох дискретних станів: (*t*, *g*-) або (*g*-, *t*). Саме за наявністю двох конформацій у пари кутів є і ζ було введено уявлення про існування двох підтипів В-форми ДНК: ВІ (є: $\zeta = t, g$ -) і ВІІ (є: $\zeta = g$ -, *t*).

Підтип ВІ відповідає класичній В-формі ДНК [51] і характеризується С2'-ендоупаковкою дезоксирибози з кутом $\delta \approx 135^\circ$, *g*- конформаціями торсійних кутів ζ і α +1 і типовими для В-ДНК значеннями $\chi \approx 260^\circ$ (таблиця 1.3).

Таблиця 1.3

Підтип ДНК Кут	иα	β	γ	δ	3	ζ	χ
BI	299	179	48	133	187	263	250
BII	293	143	46	143	251	168	278
AI	295	173	54	82	206	285	200
AII	146	192	183	85	197	289	203

Середні значення торсійних кутів (град.) для підтипів В- і А-форм ДНК

Конформації ВІ і ВІІ відрізняються станом фосфатних груп по відношенню до жолобків подвійної спіралі ДНК: у ВІ фосфат розташований практично симетрично щодо обох жолобків; у ВІІ фосфат розгорнутий у напрямку до малого жолобка (рис.1.5).



Рисунок 1.5. Діаграми двох основних конформацій А-, В-, Z-ДНК: (а) підтипи ВІ і ВІІ розрізняються орієнтацією щодо C3'O3'(і)–PO3' (і + 1) зв'язку, яка визначається кутами є і ζ [47, 52,53]; (б) підтипи АІ і АІІ розрізняються орієнтацією щодо PO5'–C5'C4 'зв'язку, яка визначається кутами α і γ [15]; (в) конформації ZI і ZII для GC кроку розрізняються орієнтацією щодо O3'P (G) – PO5'(C) зв'язку, яка визначається кутами ζ_{G} і α_{C} [54-55].

Перехід між конформаціями ВІ і ВІІ відбувається при одночасній зміні двох торсійних кутів є і ζ : кути є і ζ мають *t/g*- конформацію у ВІ і *g-/t* – у ВІІ. У ВІІ кроків пари підстав зміщені щодо осі спіралі у великий жолобок (рис.1.6). Тому підтипи В-форми ДНК можуть бути описані різницею є– ζ : \approx -90° у ВІ-ДНК і \approx +90° у ВІІ-ДНК [53]. Рівновага ВІ \leftrightarrow ВІІ чутлива до нуклеотидного складу і послідовності основ [57,58]: ВІ частіше спостерігається у кроків піримідин (R) - піримідин (R) і пурин (Y) - пурин (Y); ВІІ конформація переважає у комбінованих кроках YR і RY (таблиця 1.4).

Два або більше конформера ВІІ рідко йдуть один за одним, оскільки конформація ВІІ супроводжується локальною і глобальною деформацією структури ДНК: у тетрануклеотида, що має всі чотири фосфатні групи ВІІ типу, зафіксований вигин, аналогічний вигину в комплексах з білками [57]. Тобто, ВІІ-ВІІ кроки вимагають стабілізації зовнішніми силами, наприклад, кристалічною упаковкою або взаємодіями з білком.



Рисунок 1.6. Структура цукрофосфатного остову і розташування пар основ щодо осі спіралі в ВІ-ВІ і ВІІ-ВІІ кроках подвійної спіралі ДНК. Структури: ВІ-ВІ крок АА/ТТ, зліва, PDB іd 1ЕНV; ВІІ-ВІІ крок GG/CC, праворуч, PDB іd 3GGI [59].

Таблиця 1.4

Частота переходів у конформації BI, BII і AI, AII (%) для кроків RR, RY, YR і YY вільної ДНК [60].

Крок Підтип	RR	RY	YR	YY
BI	32,94	16,17	20,29	30,59
BII	20,11	25,44	54,43	0
AI	17,14	30,71	29,64	22,5
AII	32,72	1,8	63,63	1,8

Конформація фосфатної групи підтипу ВІІ впливає на спіральні параметри основ [57]: для неї виявлені тільки негативні значення Roll і великі значення Twist. При ~ 20% ВІІ кроків основи зміщені у великий жолобок (x-displacement позитивно), тоді як у В-форми середнє значення x-displacement -0.17 Å (таблиця 1.1). Можна відзначити тенденцію до розкриття великого жолобка у ВІІ-ДНК [51,61].

А-форма також має два підтипи: АІ (класична А-форма) і АІІ (рис.1.56). Вперше альтернативна конформація АІІ була виявлена у центрального динуклеотидного кроку CG дуплекса d(CCCCGGGG)₂ [62]. Конформації кутів α , β , γ цього кроку відповідали *t* конформації, локальний Twist менше (25°) у порівнянні з його середнім значенням для А-форми (31,1°).

У різних фрагментів ДНК, що мають А-форму подвійної спіралі, невеликий розкид значень зафіксовано у трьох з семи торсійних кутів цукрофосфатного остову (таблиця 1.4). Це кути α , γ і, в меншій мірі, β . Тому критеріями, за допомогою яких можна віднести фрагмент ДНК до AI або AII підтипу, є значення торсійних кутів α (O3'P-O5'C5 ') і γ (O5'C5'-C4'C3'). Тобто, дві конформації А-ДНК розрізняються орієнтацією дезоксирибози щодо зв'язків P-O5'-C5'-C4' [63].

Для підтипу AI характерна *g-/g*+ конформація торсійних кутів α/γ , а у AII значення торсійних кутів α/γ знаходяться в *t* області, приводячи до практично планарного розташування атомів O3'-P-O5'-C5'-C4'-C3' 3'-кінцевих нуклеотидів, яке легко приймається пуринами, і гірше – піримідинами. Такі величини α і γ можуть утворитися з класичної А-форми ($\alpha/\gamma = 300^{\circ}/60^{\circ}$), при обертанні навколо відповідних зв'язків за типом руху колінвалу («crankshaft»), ефективно компенсуючого перемикання торсійних кутів так, щоб загальний напрямок остова не змінювався [7,62]. Тобто, при AI—AII переході спостерігається скорельована зміна торсійних кутів у напрямку Р—O5'—C5'—C4', що приводить до відносної переорієнтації дезоксирибози при збереженні положення основ (рис.1.6б) [52].

Рівновага АІ↔АІІ, так само, як і ВІ↔ВІІ, залежить від нуклеотидного складу і послідовності основ: підтип АІІ частіше спостерігається у YR кроках і мало представлений у RY і YY динуклеотидів (таблиця 1.4).

РСА дослідження дозволили також встановити існування підтипів Z-форми ДНК, оскільки у деяких кристалів Z-ДНК центральний GpC крок має конформацію, відмінну від сусідніх кроків. Цей конформаційний поліморфізм Z-ДНК визначено як ZI і ZII форми [54], які класифікуються за орієнтацією фосфатної групи і можуть бути розділені за значеннями торсійних кутів ζ_G і α_C (рис.1.5в): для ZI ζ_G/α_C : -65°/- 150°, для ZII ζ_G/α_C : 70°/170° [55,56]. Стабілізують ці два підтипи Z-форми ДНК взаємодії з водним оточенням та іонами Mg²⁺ [55]. Зазвичай конформація GC кроку знаходиться в рівновазі між ZI і ZII формами, але цю рівновагу можуть змінювати іони металів: збільшення концентрації Mg²⁺ зрушує рівновагу в бік ZI конформації, а при надлишкових концентраціях Mg²⁺структура переходить в ZII конформацію [54].

1.1.4. Деформації подвійної спіралі ДНК

Структура В-форми ДНК не зберігає абсолютну регулярність уздовж ланцюгів подвійної спіралі. Конформаційні особливості і реалізація стекінг-взаємодій у різних контактах між парами основ призводять до істотної залежності локальної структури фрагмента подвійної спіралі від послідовності. Тобто, крім генетичної інформації послідовність пар основ містить інформацію і про структурні особливості ДНК. У свою чергу, сиквенс-специфічні особливості структури подвійної спіралі і схильність до конформаційних змін і деформації – основа механізмів впізнавання білками «своєї» послідовності ДНК – унікального, специфічного сайту зв'язування.

Виділяють два основних типи деформації подвійної спіралі ДНК: глобальний (вигин – bend) і локальний (злам – kink).

Вигин ДНК визначають як викривлення подвійної спіралі, поширене на кілька пар основ (рис.1.7). Цей тип деформації може бути обумовлений власною кривизною ДНК або бути наслідком взаємодії з білками.

Відповідно до концепції анізотропії [64,65,66] вигин ДНК поперек жолобків (зміна Tilt) значно слабкіше, ніж вигин у жолобки (зміна Roll). Деформація подвійної спіралі з порушенням величини кута Tilt утруднена через стекінгвзаємодії між основами уздовж ланцюга і стереохімічних обмежень, що накладаються структурою цукрофосфатного остову ДНК, які перешкоджають розтягуванню одного ланцюга і стисненню іншого [65,67].



Рисунок 1.7. Два основних типи деформації подвійної спіралі: (а) вигин ДНК; (б) злам (кінк) ДНК.

Зазвичай ДНК деформується відповідно до простого правила: пуринпіримідинові (RY) і AA/TT димери згинаються в малий жолобок, у той час як піримідин-пуринові (YR) і GG/CC димери деформуються в напрямку великого жолобка [68,69]. Найбільш часто вигини спостерігаються у послідовностей, що містять A-тракти, які складаються з AA (TT) і AT, але не TA кроків [69-72].

Іншим типом деформації структури ДНК є злам (кінк). Злам – це локальне повне або часткове порушення стекінгу окремої пари основ (рис.1.76). Злам ДНК, як правило, утворюється в напрямку малого жолобка і характерний для піримідинпуринових кроків (YR): TA, CA (TG), і CG, які в меншій мірі стабілізовані стекінгвзаємодіями, особливо, TA крок [73].

Злами можуть стабілізуватися взаємодіями з білками, особливо коли втрата стекінгу компенсується інтеркаляцією гідрофобних бічних ланцюгів, яка ще сильніше деформує динуклеотид. Наприклад, lac репресор призводить до утворення зламу ДНК в центральній CG парі основ, стабілізуючи його частковою інтеркаляцією лейцину (PDB id 2kei, рис.1.7б). Тобто, гнучкість YR динуклеотидів більшою мірою проявляється саме при утворенні білково-нуклеїнових комплексів, де ці димери утворюють кінк і служать мішенями для інтеркаляції бічних радикалів білкових ланцюгів [74].

Вигин і злам ДНК часто доповнюють один одного, як, наприклад, у разі СА кроку, прилеглого до А-тракту [75,76].

Залежність схильності подвійної спіралі ДНК до структурних перебудов від послідовності нуклеотидів інтенсивно вивчається з використанням даних РСА. Автори таких систематичних досліджень проаналізували структуру 92 білковонуклеїнових комплексів і визначили значення шести параметрів, що описують конформацію динуклеотидного кроку, для 10 можливих динуклеотидних кроків [42], і зробили такі висновки.

Різні типи контактів незначно відрізняються за: Rise (середня величина варіює в інтервалі $\approx 0,15$ Å); Shift (зміна середніх значень $\approx 0,4$ Å) і Tilt (різниця між середніми величинами $\approx 2^{\circ}$). Ще три конформаційних параметра, навпаки, істотно залежать від типу контакту. Середнє значення Twist відрізняється для різних динуклеотидних кроків на 9° (ступінь локальної спіральної закрутки ДНК змінюється залежно від послідовності пар основ); Roll змінюється в межах 5°, a Slide – на ≈ 1 Å. Автори [42] також вирахували стандартні відхилення структурних параметрів, які в певній мірі є мірою конформаційної варіабельності контакту даного типу.

Серед шести конформаційних параметрів два, які відповідають двом головним типам деформації подвійної спіралі – Twist (торсійне закручування/розкручування) і Roll (вигин), здатні до максимальних відхилень від своїх рівноважних значень. При цьому подвійна спіраль характеризується анізотропією вигину. Основний внесок саме Roll, а не Tilt, у вигин ДНК призводить до того, що подвійна спіраль значно легше згинається в бік жолобків, ніж у напрямку цукрофосфатного остову.

Конформаційна рухливість (відхилення від середніх значень всіх конформаційних параметрів, крім Rise) залежить від типу контакту (сиквенсспецифічна). При цьому зміни параметрів взаємозалежні. Одна з найбільш значущих кореляцій – негативна кореляція між Twist і Roll: збільшення одного кута, як правило, супроводжується зменшенням другого. Тобто, вигин у великий жолобок супроводжується розкручуванням спіралі, а вигин у малий жолобок – її закручуванням. Характер цієї кореляції також залежить від послідовності: деякі контакти (CA/TG, AG/CT, GG/CC) легше змінюють Twist, ніж Roll, а деякі (TA, АА/ТТ, GA/TC) – навпаки. Позитивно скорельовані між собою Tilt і Shift: тісний контакт між парами основ при вигині в сторону цукрофосфатного остову обумовлює зміщення однієї пари основ щодо іншої. Виявлена і більш складна, негативна, кореляція між Roll і Slide для всіх 10 можливих динуклеотидних контактів [77].

Таким чином, здатність динуклеотидного кроку до конформаційних перебудов сиквенс-специфічна: піримідин-пуринові (YR) динуклеотидні кроки найбільш гнучкі, а пурин-піримідинові (RY) – найменш гнучкі. Динуклеотидні кроки RR/YY характеризуються проміжною схильністю ДО деформації. Найбільш жорсткі – АТ і АС кроки, досить жорсткі кроки GG, АG і GA з практично однаковою малою схильністю до деформації, менш жорсткі AA і GC кроки. ТА крок найбільш гнучкий з максимальною схильністю до деформації [78,79]. У цілому збільшення жорсткості такий: ряд TA>CG>CA>GC≈AA<GG<AG<GA<AC<AT.

Ці висновки узгоджуються з отриманими в експериментах значеннями енергії стекінгу для окремих динуклеотидних кроків ΔG_{step} [80,81]: ефективність стекінг-взаємодій зростає в ряду YR<RR/YY<RY, більша мобільність спостерігається у GC-кроків у порівнянні з AT-кроками. Найбільш гнучкими є YR динуклеотид, проміжна конформаційна гнучкість характерна для RR (YY) динуклеотидів, а найбільш жорсткі – RY нуклеотиди.

Необхідно відзначити, що характер залежності конформації ДНК від послідовності дуже складний: конформаційні особливості визначаються не тільки найближчими сусідами – типом контакту між парами основ, але і контекстом послідовності, В яку «вбудований» динуклеотидний крок. Наприклад, злами частіше виникають у центральних CG кроках у тетрамерів ACGA, ACGC, ACGG, CCGG і GCGC через високу конформаційну гнучкість цих послідовностей, яка визначається не тільки рухливістю СС динуклеотиду, але і типом нуклеотидів по обидва боки центрального димера. Гнучкими є RCGR, RCGY або YCGR тетрамери, але не YCGY. Найгнучкішою виявилася послідовність ТТАС, а найбільш жорсткою – ААТТ [82].

1.1.5. Конформаційна динаміка ДНК і її роль у процесі білково-нуклеїнового впізнавання

Поліморфізм ДНК і здатність до змін структури подвійної спіралі особливо важливі для надійного впізнавання білками певних сайтів ДНК при формуванні білково-нуклеїнових комплексів [60]. Зв'язування білків, як правило, призводить до змін орієнтації основ і структури цукрофосфатного остову. Такі локальні конформаційні зміни ДНК можуть викликати утворення вигинів або зламів, як спостерігається, наприклад, у сиквенс-специфічному САР-ДНК комплексі [83] або при закручуванні ДНК навколо гістонів і формуванні нуклеосом [84]. Очевидно, сиквенс-специфічні відхилення структури ДНК від канонічної В-форми є скоріш правилом, ніж винятком, і вони, безсумнівно, грають істотну роль у процесі білково-нуклеїнового впізнавання [85]. Необхідність детального дослідження механізмів конформаційної мінливості ДНК при утворенні комплексів з білками диктується також тим, що поки не вдається сформулювати універсальні правила сиквенс-специфічного білково-нуклеїнового впізнавання, аналогічні принципу комплементарності, який керує процесом формування подвійної спіралі ДНК [86].

Діккерсоном та іншими авторами [10,11,20,21] було висловлено припущення про те, що на основі аналізу структурних параметрів різних нуклеотидних послідовностей і подальшого об'єднання результатів такого аналізу з даними про контакти основ і амінокислотних залишків у білково-нуклеїнових комплексах, можна визначити, як структура подвійної спіралі залежить від нуклеотидної послідовності і встановити основні правила «впізнавання» білками певних («своїх») послідовностей ДНК. Але до теперішнього часу ці правила не сформульовані, перш за все, через високу конформаційну рухливість ДНК і непередбачуваність при реалізації взаємодій амінокислота – основа у сайтах зв'язування. Тобто ідея про «коди впізнавання» між амінокислотами і нуклеотидами поки не знаходить підтвердження [87].

1.2. Комплекси ДНК-білки: специфічність і механізми впізнавання

Комплексоутворення білків з нуклеїновими кислотами відбувається на всіх етапах експресії генів і її регуляції. Білково-нуклеїнові комплекси високоспецифічні: білок розпізнає «свій» сайт зв'язування, відібравши його з численних конкуруючих і неспецифічних послідовностей, і зв'язується з ним.

1.2.1. Загальні уявлення про специфічність білково-нуклеїнових комплексів і механізми білково-нуклеїнового впізнавання

Комплекси білків з ДНК характеризуються спорідненістю і специфічністю. Спорідненість – це існування стерично і хімічно комплементарних поверхонь обох молекул у сайтах зв'язування [88,89]. Білки можуть взаємодіяти з ДНК, не проявляючи однозначної спорідненості до певної послідовності, а розпізнаючи ДНК як таку [90], наприклад, у процесі компактизації при утворенні нуклеосом [84].

Практично всі білки здатні утворювати і специфічні, і неспецифічні комплекси [91-93]. Спеціфічність – це селективне зв'язування білка на конкретних сайтах ДНК. Вона обумовлена відмінністю величини спорідненості білка до послідовності ДНК сайту-мішені та інших ділянок [94].

Спорідненість кількісно визначають через константи асоціації (K_{ac}), які, при зв'язуванні білків зі «своєю» і «чужими» послідовностями ДНК відрізняються на декілька порядків: для специфічних комплексів $K_{ac} = 10^{10} - 10^{12} \text{ M}^{-1}$ (але не менше 10^6 M^{-1}), для неспецифічних $K_{ac} = 10^4 \text{ M}^{-1}$ і нижче. Діапазон змін вільної енергії зв'язування для специфічних комплексів -16 ÷ -7 ккал/моль, для неспецифічних — -8 ÷ -5 ккал/моль [93,95]. Одним з критеріїв специфічності прийнято також вважати зміну теплоємності: специфічне зв'язування характеризується її великою негативною зміною (-1,1 ÷ -1,3 ккал/моль[°]K), а неспецифічне – близькою до 0 [90,91].

У сіквенс-специфічних комплексах білок зв'язується з однією або декількома послідовностями ДНК, які проявляють найбільшу спорідненість до даного білку [96]. Більше тридцяти років тому було висловлено припущення, що сиквенс-специфічне білково-нуклеїнове впізнавання визначається здатністю білків утворювати Н-зв'язки зі специфічними групами основ у місцях контактів [87]. Пізніші дослідження показали, що специфічні групи основ не дають достатньої бази для сиквенс-специфічного «коду впізнавання» ДНК білками [86,97,98]. Важливим чинником також є здатність до деформації і структурні особливості фрагмента ДНК, з яким зв'язується білок, і безпосередньо залежить від послідовності [99,100-102].

У даний час сформульовані характеристики двох основних механізмів білково-нуклеїнового впізнавання.

(1) Пряме, або специфічне впізнавання (Direct Readout). При цьому білки взаємодіють з послідовностями ДНК, формуючи прямі контакти (Н-зв'язки) між амінокислотними залишками і унікальними атомними групами основ (заступниками в положеннях С4 пирімидінів і\або С6 і N6 пуринів) у великому жолобку [99,100].

(2) Непряме впізнавання (Indirect Readout), при якому білок взаємодіє з неспецифічними групами основ і цукрофосфатного остову, а впізнавання обумовлено унікальністю конформації певної ділянки ДНК або його здатністю до деформації [99-101,103-105]. Критеріями впізнавання можуть бути зміни локальної геометрії пар основ або цукрофосфатного остову; вигини або злами фрагменту ДНК; особливості рельєфу великого і малого жолобків; впорядкована гідратна оболонка. Такі особливості структури існують у конкретному фрагменті ДНК спочатку або виникають у результаті зв'язування з лігандами (білками, іонами, біологічно активними малими молекулами) і дегідратації сайту зв'язування, що передують даній взаємодії.

Необхідно підкреслити, що розподіл на прямий і непрямий механізми досить умовний, оскільки в реальних умовах вони часто використовуються спільно, забезпечуючи безпомилкове впізнавання і надійне зв'язування. Внески двох механізмів у реалізацію білково-нуклеїнового впізнавання варіюють у залежності від послідовності ДНК в сайті зв'язування, сімейства білків та інших факторів. Відносний внесок визначається структурою фрагмента ДНК і конкретним типом білка, що утворюють комплекс. Тому важко оцінити відносний внесок обох механізмів і встановити загальні правила білковонуклеїнового впізнавання [106].

У даний час прямий і непрямий механізми розглядають ширше, враховуючи здатність білків розпізнавати: (1) лінійну послідовність нуклеотидів – унікальну хімічну основу впізнавання (Base Readout); (2) залежну від послідовності форму сайту зв'язування (Shape Readout). Перший механізм реалізується у великому і/або малому жолобках, другий – при впізнаванні глобальних і/або локальних особливостей структури конкретних послідовностей ДНК [97].

Згідно можливої схеми зв'язування білків з ДНК, на першому етапі утворюється неспецифічний комплекс за рахунок електростатичних взаємодій з подальшими «слайдингом» молекули білка уздовж ланцюга ДНК, впізнавання «своєї» послідовності і утворенням специфічного комплексу, які супроводжуються структурною адаптацією обох молекул (другий етап) [87,107-109].

З точки зору енергетики комплексоутворення формування неспецифічного комплексу відбувається за рахунок ентропійних складових (насамперед це процеси дегідратації сайтів зв'язування білка і ДНК і звільнення протиіонів), а специфічного – в результаті ентальпійного вкладу (реалізації всіх можливих взаємодій у місцях безпосередніх контактів) у вільну енергію зв'язування.

Спільний аналіз структурних даних і фізико-хімічних властивостей комплексів, що використовують обидва механізму впізнавання – прямий і непрямий, дозволив визначити всі білково-нуклеїнові контакти і розділити міжатомні взаємодії за видами (електростатичні, ван-дер-ваальсові, гідрофобні взаємодії [110,111-113]; створення Н-зв'язків [114,115], включаючи зв'язки СН ... О [116]; взаємодії катіон – π -система [117]; взаємодії, що здійснюються через молекули зв'язаної води [118,119]) і по можливим їх місцях утворення [113]. У комплексах, у середньому, 47% всіх контактів утворюються з фосфатами, 29% – з дезоксирибозою, а з основами – тільки 24%. Найпоширенішим видом білково-нуклеїнових взаємодій є Н-зв'язки. Основним місцем таких контактів виявилися не основи, а атоми кисню фосфатних груп (62% Н-зв'язків). Ван-дер-ваальсові взаємодії (22%) частіше утворюються з атомами цукрофосфатного остову ДНК (62%), а на гідрофобні взаємодії припадає 19% всіх контактів ДНК-білок, і це основний вид взаємодій для дезоксирибоз (63%). Місцем реалізації електростатичних взаємодій (8%) мали б бути атоми кисню фосфатних груп, але виявилося, що тільки 16% з 47% взаємодій білків з фосфатними групами – електростатичні. Решта – це Н-зв'язки та інші вили взаємолій.

1.2.2. Пряме білково-нуклеїнове впізнавання

При прямому механізмі білки впізнають і виділяють певні пари основ між ДНК. утворюючи комплементарні Н-зв'язки бічними ланцюгами амінокислотних залишків і донорно-акцепторними групами основ у жолобках подвійної спіралі (рис.1.8). У великому жолобку найбільший потенціал для утворення Н-зв'язків має гуанін (акцептори C6 = O, N9), потім (у порядку його зменшення), аденін (донор C6-NH₂), цитозин (донор C4-NH₂) і тимін (акцептор C4 = O4). Таким чином, у великому жолобку формується залежний від послідовності унікальний набір донорно-акцепторних груп [87]. У аденіна, цитозина і тиміна в малому жолобку по одному акцептору (атоми N3, O2 і O2, відповідно); у гуаніна – один акцептор (атом N3) і один донор (атоми водню C2 N2H₂ груп).

У цілому, великий жолобок характеризується більшою кількістю сайтів, які утворюють Н-зв'язки і беруть участь в інших видах взаємодій, наприклад, гідрофобних [113]. Великий жолобок В-ДНК стерично комплементарний αспіралі білків [99]. Тому білки можуть вбудовуватися α-спіраллю у великий жолобок і утворювати специфічні Н-зв'язки з основами, впізнаючи «свою» ділянку ДНК за прямим механізмом.



Рисунок 1.8. Потенційні сайти утворення Н-зв'язків між ДНК і білками у великому і малому жолобках.

Аналіз геометричного розташування донорних і акцепторних груп у жолобках ДНК показав [87], що одного Н-зв'язку недостатньо для однозначного

відбору пари основ у процесі прямого впізнавання. Тому для однозначного розпізнавання комплементарної пари нуклеотидів необхідно, як мінімум, два Нзв'язки в місцях контактів [87], що і є основою високої специфічності.

Оскільки енергія Н-зв'язків залежить від взаємної орієнтації і відстані між донором і акцептором у зоні контакту і, з огляду на наявні просторові обмеження для деформації взаємодіючих молекул, саме можливість утворення Н-зв'язків і їх енергія можуть бути чинниками відбору в процесі впізнавання білком «своєї» послідовності ДНК [98].

Неспецифічні Н-зв'язки найбільш часто утворюються в місцях контактів білків з групами цукрофосфатного остову ДНК без значущих переваг при взаємодії амінокислот з нуклеотидами.

Гідрофобні контакти бічних ланцюгів неполярних амінокислот з основами, як правило, виникають при інтеркаляції ділянки білка в малий жолобок і супроводжуються вигинами ДНК в сторону великого жолобка [39,120]. Електростатичні взаємодії утворюються між позитивно зарядженими амінокислотними ланцюгами і атомами кисню фосфатів, беручи участь у преорієнтації поліпептидних ланцюгів по відношенню до молекули ДНК на першому етапі зв'язування і стабілізуючи комплекс, що сформується на другому етапі [121].

Специфічне білково-нуклеїнове впізнавання, яке реалізується у великому жолобку з переважанням прямого механізму, притаманне багатьом білкам: ендонуклеазам, репресорам, деяким транскрипційним факторам [122]. Ці білки мають високу специфічність, зв'язуючись з конкретними послідовностями ДНК – промоторами або енхансерами. Менш поширене специфічне зв'язування в малому жолобку за рахунок високоспецифічних гідрофобних взаємодій з основами.

Розглянемо комплекс ДНК з транскрипційним фактором LEF-1 (lymphoid enchancer factor-1) (рис.1.9) [123]. У цьому комплексі залишок метіоніну специфічно вбудовується тільки в АА динуклеотидний крок ДНК в сайті зв'язування (рис.1.9б) [97,90] і формує специфічні Н-зв'язки у великому жолобку (рис.1.9в). Але для багатьох регуляторних білків високоспецифічне впізнавання «свого» сайту-мішені відбувається без утворення комплементарних Н-зв'язків, а використовується стерична відповідність взаємодіючих поверхонь обох молекул

і/або ван-дер-ваальсові контакти між бічними ланцюгами або остовом білка і основами [124].



Таким чином, прямий механізм впізнавання передбачає високу стереохімічну відповідність певних послідовностей ДНК місцям контактів на поверхні білкових молекул і можливість утворення специфічних Н-зв'язків з атомами основ, переважно спрямованих у великій жолобок подвійної спіралі. Основний внесок у специфічність білково-нуклеїнових комплексів вносять прямі контакти між бічними групами білків і специфічними групами основ ДНК.

1.2.3. Непряме білково-нуклеїнове впізнавання

При непрямому механізмі впізнавання ділянка ДНК розпізнається або за неканонічною формою подвійної спіралі, яка існує у вільній ДНК, або за можливістю ДНК до деформації і/або переходу в альтернативну конформацію в

комплексі [107]. Перевага енергії неканонічної структури над канонічною в першому випадку і енергетичні витрати, необхідні для переведення ДНК в альтернативну конформацію в другому, сиквенс-специфічні [125].

Систематичний аналіз даних РСА різних фрагментів ДНК дозволив зробити висновок про те, що здатність подвійної спіралі ДНК приймати альтернативні конформації є її «внутрішньою» властивістю, яку мають певні послідовності ДНК [60,101,126]. Різні за нуклеотидним складом короткі фрагменти ДНК можуть як зберігати структуру класичних А- або В-форм подвійної спіралі, так і приймати проміжні стани або зазнавати конформаційних переходів [40,127]. Наприклад, кроки GG і CG виявляють тенденцію до спонтанного переходу в А-форму у вільній ДНК [128-130], тобто можуть бути конформаційним «сигналом» при утворенні білково-нуклеїнових комплексів.

Нуклеотиди з А- або В-конформаціями цукрофосфатного остову мають різну схильність до реалізації білково-нуклеїнових взаємодій [39,113]. Виявилося, що хоча фракція А-подібних нуклеотидів у ДНК в комплексах невелика (12%), середня кількість білково-нуклеїнових контактів на один Аподібний нуклеотид в 1,6 раз вище, ніж на В-подібний (2,5 і 1,6 контактів на нуклеотид, відповідно).

Аналіз площі доступної поверхні (ПДП) атомів В- і А-подібних нуклеотидів, зміна якої пов'язана з перемиканням конформації дезоксирибози з С2'-ендо- (В-форма) в С3'-ендо- (А-форма), показав збільшення доступності гідрофобних атомів А-подібних нуклеотидів у малому жолобку [39]. Саме тому взаємодії амінокислот з двома формами ДНК у малому жолобку розподілені повзаємодіють А-подібні частіше різному: нуклеотиди неполярними 3 амінокислотними залишками, a В-подібні нуклеотиди позитивно — 3 зарядженими. Коли А-подібні нуклеотиди формують кластери уздовж ланцюга, взаємодії з гідрофобними поверхнями білків відбуваються кооперативно і переважно з β-шарами [131]. У цих сайтах часто утворюються вигини ДНК, як правило, в піримідин-пуринових (YR) кроках, які мають найбільшу схильність до структурних перебудов [39]. З огляду на те, що можливості для розпізнавання ДНК за допомогою специфічних Н-зв'язків у малому жолобку невисокі,
переходи ДНК у А-форму і виникнення гідрофобних взаємодій можуть бути важливими факторами непрямого впізнавання.

Для А-трактів характерна неканонічна В' конформація подвійної спіралі [9], яка має вузький малий жолобок з концентрацією негативно заряджених фосфатів більшою, ніж у канонічній В-ДНК. У такому зміненому малому жолобку Атрактів формується унікальна гідратна оболонка [132], яка включає до чотирьох шарів молекул води і призводить до ще більшого звуження малого жолобка та збільшення його електростатичного потенціалу, полегшуючи впізнавання білками цих ділянок ДНК [71]. А-тракти часто локалізуються поблизу промоторних ділянок генів бактерій і вищих організмів і/або ділянок ініціації реплікації і рекомбінації, будучи мішенями для утворення комплексів з білками, які беруть участь у регуляції цих важливих біологічних процесів.

Ще одним фактором непрямого впізнавання білками ДНК є сиквенсспецифічна здатність подвійної спіралі ДНК до деформації як у вільному стані, так і при її взаємодії з білком. Найбільш легко деформуються піримідинпуринові кроки YR [133], потім слідують кроки RR і RY. Найгнучкіший тетрамер – TTAG, а найбільш жорсткий – ААТТ [82].

У комплексі репресора trp (регуляторний білок, який контролює ініціацію транскрипції оперона біосинтезу триптофану і деяких інших оперонів *E.coli*) з ДНК [105] реалізується непряме впізнавання (рис.1.10): утворюються прямі і опосередковані молекулами води неспецифічні Н-зв'язки з цукрофосфатним остовом і тільки два специфічні Н-зв'язки з основами – з гуаніном у крайніх положеннях сайту зв'язування.

Результати моделювання методом молекулярної динаміки [134] показали, що в місцях контакту ДНК і білка деякі нуклеотиди мають альтернативну ВІІ конформацію і, що більш важливо, виявлена кореляція між ВІ/ВІІ конформаціями і числом контактів білка з нуклеотидами в цих конформаціях. Тобто, ВІ/ВІІ переходи цукрофосфатного остову ДНК можуть служити основою специфічності непрямого впізнавання.

Структура репресора бактеріофага Р22 відноситься до типу «спіраль-вигинспіраль». При утворенні комплексу α-спіралі білка вбудовуються у великі жолобки, утворюючи Н-зв'язки зі специфічними групами основ. Але специфічність комплексу визначається не тільки зв'язуванням у місцях контакту а-спіралей з ДНК, а й нуклеотидною послідовністю в проміжку між цими зонами, де немає специфічних зв'язків з основами і впізнавання відбувається за непрямим механізмом (рис.1.10б). ДНК при зв'язуванні а-спіралей зазнає істотну деформацію в проміжку між ділянками контакту (В \rightarrow B' перехід), і використовує при впізнаванні «свого» сайту зв'язування відмінності енергій В \rightarrow B' переходу у різних динуклеотидних кроках: заміна навіть однієї пари основ змінює енергетичний бар'єр такого переходу. У результаті спорідненість репресора Р22 до «своєї» і зміненими послідовностями ДНК різниться [128], і білок розпізнає сайт-мішень.



Рисунок 1.10. Структури комплексів ДНК з: (a) репрессором trp, PDB id 1TRO, виділені нуклеотиди, що утворюють Н-зв'язки з білком; (б) репресором бактеріофага P22, PDB id 1RPE.

Таким чином, непрямий механізм заснований на структурній адаптації послідовностей ДНК в сайтах зв'язування з білком. Специфічність комплексів визначаться взаємодіями, в результаті яких утворюється альтернативна структура конкретної послідовності ДНК, яка і впізнається білком. При цьому специфічні групи основ можуть не вступати в прямі контакти з білком.

Чутливість певних фрагментів ДНК до взаємодій з функціональними групами білків може обумовлюватися залежним від послідовності просторовим і енергетичним «кодом», який визначається здатністю конкретної ділянки ДНК до деформації. Параметри, які використовуються для кількісного опису прямого механізму, це відмінності в енергіях зв'язування білка з різними послідовностями, а непрямого механізму – енергії деформації конкретних нуклеотидних послідовностей.

 1.2.4. Конформаційні перебудови цукрофосфатного остову фрагментів ДНК в комплексах з білками і їх сиквенс-специфічність

Відомо, що конформація ДНК в комплексах з білками відрізняється від канонічної В-форми подвійної спіралі [98,108,109], але такі деформації можуть існувати і у вільної ДНК [96,105]. У процесах конформаційних перебудов істотну роль грає варіабельність цукрофосфатного остову ДНК, який зв'язує і «направляє» основи в ланцюгах ДНК. Властива остову гнучкість дозволяє контролювати положення основ таким чином, щоб локальна ДНК будувалася згідно 3 балансом між структура оптимальним розташуванням основ і кращою конформацією дезоксирибози [60]. Цей баланс енергетичною вигідністю певних конформацій остову і визначається енергетичними бар'єрами переходів між його канонічними і альтернативними станами, величини яких сиквенс-специфічні [40,109]. Тобто, структурні і фізико-хімічні параметри цукрофосфатного остову ДНК можуть визначати не тільки здатність до структурної адаптації певних фрагментів ДНК в комплексах з білками, а й служити дискримінаційним фактором при відборі білком «свого» сайту зв'язування [135].

Типові перебудови цукрофосфатного остову в білково-нуклеїнових комплексах – зміни чотирьох торсіонних кутів полінуклеотидного ланцюга: α (O3'-P-O5'-C5'), γ (O5'-C5'-C4'-C3'), ε (C4'-C3'-O3'-P) і ζ (C3'-O3'-P-O5') (рис.1.3б).

Одночасне перемикання кутів є і ζ з канонічного стану є/ ζ : trans (*t*)/gauche-(*g*-) з (є- ζ) ≈ -90° в неканонічне є/ ζ : *g*-/*t* з (є- ζ) ≈ + 90° у нуклеотидів, що містять дезоксирибози з В-подібної конформацією (кут псевдообертання 90°<Р<210°), є основою їх поділу на класичні В-подібні нуклеотиди (BI) і альтернативні (BII) конформери [47].

Альтернативна ВІІ конформація виявлена у вільній ДНК (18%) і у ДНК в комплексах з білками (11%) [58,136,137]. Така перебудова поєднується з

негативним значенням Roll, збільшенням Twist, позитивним Slide [57,138,139-141] і призводить до розширення та зменшення глибини великого жолобка. Переходи в BII конформацію спостерігаються в комплексах ДНК з білками різних сімейств: у репресорів (trp repressor [109]) і транскрипційних факторів (transcription factor NF- κB [142]). Згідно з даними ЯМР і молекулярного моделювання, взаємодії транскрипційного фактора NF- κB з його сайтом зв'язування на ДНК – d(CTGGGGGACTTTCCAGG)₂ визначається BI \rightarrow BII переходом у фланкуючих TG і CA кроках, які призводять до вигину осі спіралі ДНК і розширенню великого жолобка. У результаті збільшується доступність донорно-акцепторних груп основ, які формують великий жолобок і беруть участь в утворенні специфічних H-зв'язків з білком. Сиквенс-специфічність переходів у BII конформацію досліджувалася при аналізі даних PCA і методом молекулярно-динамічного моделювання [60,140,141]. Виявилося, що переходи в BII конформацію характерні для CG, GC, GA, CA, TG і AA кроків, тоді як піримідин-піримідинові (YY) кроки в BII конформацію не переходять.

Значно менше відомо про роль у реалізації механізмів білковонуклеїнового впізнавання пари кутів цукрофосфатного остову α і γ , переходи яких в альтернативні конформації у РНК і ДНК, як правило, скорельовані [47,143]. Значення пари цих кутів використовується для поділу нуклеотидів з А-подібною упаковкою дезоксирибози (-30°<P<90°) на класичні АІ конформери з α/γ : *g-/g*+ і альтернативні АІІ конформери з α/γ : *t/t* [144].

Більшість В-подібних нуклеотидів мають класичні значення α/γ : *g-/g+*, а α/γ з *t/t* конформаціями утворюють окреме сімейство «перемкнених» ВІ конформерів [60]. Результати РСА досліджень і молекулярно-динамічного моделювання показали, що можливі інші комбінації значень кутів α/γ для В-подібних нуклеотидів: *g+/g-* і *g+/t* [60,58]. Альтернативні стани В-ДНК з α/γ :*t/t* призводять до зміни спіральних параметрів: Twist зменшується, а Roll має позитивну величину. Але альтернативна комбінація α/γ :*g+/g-* не викликає таких ефектів: значення Twist і Roll не змінюються [58]. Альтернативні конформації пари α/γ можуть впливати на глобальні структурні параметри фрагментів ДНК в комплексах з білками: нуклеотиди з альтернативними конформаціями кутів α/γ

призводять до розкручування (Twist ~ 31.2°) і вигину (вигин ~ 28°) фрагментів ДНК [58].

Аналіз даних РСА показує, що неканонічні значення α/γ рідко зустрічаються у вільній ДНК (~ 2%), та істотно частіше – у ДНК в комплексах з білками (~ 8%) [49,58], визначаючи тим самим важливість таких перебудов для комплексоутворення. У цукрофосфатному остові нуклеосом спостерігається періодичне чергування ВІ і ВІІ конформацій, причому в сайтах прямих контактів ДНК з гістонами розташовані нуклеотиди з найбільш деформованої В-формою, які мають альтернативні конформації пари кутів α/γ [136].

Була також виконана оцінка енергії деформації цукрофосфатного остову ДНК: в середньому енергетичний бар'єр переходу кутів α/γ між *g-/g+* і *t* конформаціями становить 5 ÷ 7 ккал/моль, тоді як переходи *g-* \rightarrow *g+* для α і *g+* \rightarrow *g-* для γ менш вигідні (~ на 5 ккал/моль [49]).

1.2.5. Вплив конформаційних перебудов подвійної спіралі ДНК на полярність і електростатичний потенціал жолобків

Локальні порушення форми подвійної спіралі ДНК можуть призвести не тільки до змін її структурних параметрів, а й до змін фізико-хімічних властивостей, характерних для певних конформацій ДНК, особливо для відносно коротких послідовностей.

Один з найважливіших фізичних параметрів подвійної спіралі ДНК – розподіл електростатичного потенціалу, оскільки ДНК – це поліаніон. Негативний заряд ДНК переважно локалізований на фосфатних групах [145,146,147]. Дезоксирибоза частково компенсує цей заряд і створює можливість для реалізації гідрофобних взаємодій на додаток до гідрофобних функціональних групах основ, таких як метильні групи тиміну.

Для ідеальної спіралі В-ДНК негативний електростатичний потенціал АТпослідовностей у малому жолобку вищий, ніж у GC-послідовностей [148]. Ця різниця викликана присутністю різних електронегативних і електропозитивних атомів у A/T і G/C пар основ: G/C пара в малому жолобку має позитивно заряджену $N2H_2$ групу гуаніна. У разі послідовності А/Т пар (А-тракт) на збільшення електронегативного потенціалу малого жолобка впливає негативний заряд N3 атому аденіна і O2 атому тиміна, а також тенденція А/Т пар приводити до звуження малого жолобка [85,97,149]. Таким чином, електростатичний потенціал ДНК корелює з вмістом GC пар, але одночасно виявляє залежність від нуклеотидного складу та конформації сусідніх ділянок ДНК [150].

Протягом декількох десятиліть вивчався можливий зв'язок між формою і електростатичним потенціалом взаємодіючих поверхонь білків і ДНК при їх комплексоутворенні [112,151,152], але вплив структурних перебудов ДНК на значення електростатичного потенціалу і його розподіл виявлені і описані відносно недавно [97,153]. Зменшення розмірів малого жолобка призводить до зближення фосфатних груп, що, в свою чергу, викликає збільшення (за абсолютною величиною) значення його негативного електростатичного потенціалу [154,149].

Один із способів реалізації непрямого механізму впізнавання (shape readout) складається у «впізнавання» А-трактів білками, що містять позитивно заряджені залишки аргінінів у місцях білково-нуклеїнових контактів [85,149,153]. Вивчення ролі геометрії малого жолобка ДНК у впізнаванні білками специфічного сайту зв'язування показало, що білки НОХ групи можуть розпізнавати мінімальні зміни його розмірів і електростатичного потенціалу [155, 156]. Тобто, непрямий механізм впізнавання включає в себе будь-яку форму структурних «сигналів» і ґрунтується на локальних і глобальних структурних характеристиках подвійної спіралі (жорсткість, конформаційна рухливість), залежних від геометрії подвійної спіралі значеннях і розподілі електростатичного потенціалу та ïΧ сиквенсспецифічності [157-159]. Значення і розподіл електростатичного потенціалу також залежить від розподілу електронної щільності поблизу окремих основ, пар нуклеотидів, від конформації дезоксирибози і положення фосфатних груп щодо краю жолобків [149].

Утворення багатьох білково-нуклеїнових комплексів вимагає В-А переходів подвійної спіралі ДНК, як правило, для GC ділянок. У комплексі

Тс3 транспозази з ДНК виявлено ділянку з істотним електронегативним потенціалом в області фрагмента, що містить гуанін з А-подібним великим жолобком [160,161]. Білок Тс3 транспозази має декілька позитивно заряджених бічних груп амінокислотних залишків, які взаємодіють як з великим жолобком, так і з вузьким малим жолобком, утворюючи неспецифічні Н-зв'язки і сольові містки [160]. Ймовірно, такий унікальний розподіл електростатичного потенціалу навколо А-подібного фрагмента подвійної спіралі грає важливу роль у біологічних процесах [162].

Варіації полярно-неполярного профілю ДНК при В \rightarrow А перебудові дезоксирибози і переході цукрофосфатного остову в неканонічні конформації, зокрема, зміна гідрофобної поверхні ДНК, також є істотним дискримінаційним фактором, що впливає на відбір конкретних сайтів ДНК при комплексоутворенні з білками [39,160].

Наприклад, В — А перемикання упаковки дезоксирибози в білковонуклеїнових комплексах полегшує механізм впізнавання в малому жолобку, де Н-зв'язків утворення неефективно для високоспецифічного відбору послідовностей ДНК. Можливість реалізації впізнавання в цьому випадку досягається збільшенням гідрофобної поверхні малого жолобка, що сприяє утворенню контактів з гідрофобними ділянками взаємодіючого білка [39]. Необхілно відзначити тільки одне дослідження, в якому проведено статистичний аналіз площ доступної поверхні (ПДП) нуклеотидів для 85 невироджених фрагментів ДНК (вільної і в комплексах з білками) [163]. Виявилося, що нуклеотиди, які містять тимін, мають великі ПДП атомів та існує залежність їх ПДП від типу і стану сусідніх нуклеотидів. Але автори не розділяли нуклеотиди за упаковкою дезоксирибози (віднесення до А- або Вподібним нуклеотидам) і значенням кутів цукрофосфатного остова.

Таким чином, аналіз інформації про конформаційну і деформаційну рухливість ДНК у вільному стані або при утворенні білково-нуклеїнових комплексів дозволяє зробити деякі узагальнення.

Здатність подвійної спіралі ДНК приймати альтернативні конформації, в тому числі цукрофосфатним остовом, є «внутрішньою» властивістю, яку мають певні послідовності ДНК. Конформаційні перебудови подвійної спіралі

можуть бути потенційними джерелами прояви унікальних особливостей геометрії різних олігонуклеотидів, зокрема, динуклеотидних кроків і/або окремих нуклеотидів і призводити до порушення стекінгу основ і/або зміни площі доступної поверхні атомів, і критеріями для впізнавання певної ділянки ДНК білком. Але висунуті вище припущення не є доведеними і вимагають подальших досліджень.

Здатність подвійної спіралі ДНК до деформації і її сиквенс-специфічність може використовуватися білками при впізнаванні сайту зв'язування на рівні відбору «правильного» олігонуклеотиду: тетрануклеотиду і/або динуклеотидних кроків, які характеризуються високою схильністю до деформації. Такі кроки повинні розташовуватися на певних інтервалах, щоб посилити цю схильність і змінити геометрію фрагменту ДНК так, щоб структура сайту забезпечувала стеричну комплементарність з білком і полегшувала формування специфічних і неспецифічних білково-нуклеїнових контактів. Локальні варіації структури цукрофосфатного остову також можуть бути «сигналами» при реалізації непрямого механізму білково-нуклеїнового впізнавання і брати участь у процесі структурної «підгонки» сайту зв'язування ДНК. Конформаційна варіабельність торсійних кутів цукрофосфатного остова, зокрема кутів α/γ, може бути одним з факторів, що пояснюють механізм реалізації непрямого впізнавання конкретної послідовності ДНК, але ця проблема ще не вивчалася систематично.

У результаті зміни конформації змінюються і деякі фізичні властивості, що залежать від структури, наприклад, полярно-неполярний профіль і електростатичний потенціал малого і великого жолобків, що також може бути використано білками для впізнавання конкретного сайту ДНК. Ця проблема і, зокрема, залежність від конформації цукрофосфатного остову і сиквенсспецифічність полярно-неполярного профілю і електростатичного потенціалу малого та великого жолобків у вільній ДНК і у ДНК в комплексах з білками також не досліджувалась систематично.

Необхідно також підкреслити, що систематичний аналіз впливу переходів кутів цукрофосфатного остову, зокрема, кутів α/γ на полярно-неполярний профіль

жолобків ДНК і їх сиквенс-специфічність не проводився, хоча результати таких досліджень дуже перспективні для розуміння механізмів непрямого впізнавання.

Таким чином, проведений аналіз сучасного стану проблеми дозволив нам сформулювати задачі нашої роботи:

- На основі аналізу структурних PDB і NDB баз даних визначити тип і кількість структурних перебудов цукрофосфатного остову вільної ДНК і ДНК в комплексах з білками; зміну площ доступної поверхні атомів, які формують жолобки подвійної спіралі при конформаційних перебудовах цукрофосфатного остову; кількість і вид білково-нуклеїнових контактів у комплексах.

- Визначити і проаналізувати фізичні характеристики вільної ДНК і ДНК в комплексах з білками, а саме: величину і розподіл електростатичного потенціалу малого жолобка олігонуклеотидів вільної ДНК; полярність жолобків подвійної спіралі вільної ДНК і в комплексах з білками.

 Встановити сиквенс-специфічність структурних перебудов цукрофосфатного остову і фізичних характеристик вільної ДНК і ДНК в комплексах з білками та на прикладах конкретних структур, доступних у PDB і NDB базах даних, проаналізувати спостережувані перебудови цукрофосфатного остову, пов'язані з ними зміни фізичних характеристик та формування певних типів білково-нуклеїнових контактів у сайтах зв'язування.

 Визначити особливості конформації цукрофосфатного остову ДНК у складі нуклеосом, кількість і розподіл нуклеотидів зі зміненим структурним станом полінуклеотидного ланцюга.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Відбір структур для створення бази даних.

База даних була створена на основі координат атомів кристалічних структур різних фрагментів ДНК (вільні А-ДНК і В-ДНК, не зв'язані з білком, та комплекси ДНК-білок), які взяті з Nucleic Acid Data Bank (June 2012) [164]. Повний список 187 структур білково-нуклеїнових комплексів, вільних А- і В-ДНК і нуклеосом, обраних для подальшого аналізу, наведено в додатку, таблиця 1. Для аналізу структури відбиралися за наступними критеріями:

• Роздільна здатність, за якою були отримані структури ДНК та комплексів вища, ніж 1.9 Å. Згідно Schneider і співавторами [47], такий рівень роздільної здатності методу РСА забезпечує точне визначення конформації кільця дезоксирибози і торсійних кутів цукрофосфатного остову ДНК, а також дозволив провести статистичний аналіз їх розподілу. Для того, щоб переконатися, що розрахункові процентні частки різних конформацій кута у, визначені для фрагментів вільної ДНК і ДНК в складі білково-нуклеїнових комплексів, не є функцією роздільної здатності структур, які використовуються при аналізі, додатково було проведено аналогічний розрахунок визначення процентної частки різних конформацій кута у для кристалографічних структур, отриманих з роздільною здатністю порядку 1,5 Å [165]. Така роздільна здатність гарантує задовільне визначення окремих атомів. Отримані процентні частки різних конформацій кута у (додаток, таблиця 2) близькі до результатів для структур, отриманих з роздільною здатністю до 1,9 Å. Однак, мала кількість доступних кристалографічних структур, отриманих з роздільною здатністю 1,5 Å, робить будь-який статистичний аналіз цих даних неможливим. Таким чином, всі подальші дослідження виконувалися для структур, отриманих з роздільною здатністю 1,9 Å.

• Всі олігонуклеотиди ДНК мають подвійну спіраль і містять більше чотирьох нуклеотидів у кожному ланцюзі.

• Для аналізу вибиралися структури з немодифікованими основами.

 Набір структур білково-нуклеїнових комплексів, використаних для аналізу є негомологічним, тобто з групи комплексів з однаковим білком вибиралася одна структура, яка отримана з найкращою роздільною здатністю.

Попередня підготовка структур включає видалення неспарених і термінальних нуклеотидів з обох кінців фрагмента ДНК, щоб уникнути кінцевих ефектів, а також розділ олігонуклеотидів, що мають модифіковані основи або одно-/дволанцюгові розриви ДНК, на два фрагменти таким чином, щоб модифіковані основи і пари основ біля розриву ДНК отриманих частин були кінцевими і виключалися з розрахунку. Детальна схема процесу відбору структур показана на рисунках 2.1a, b.



Рисунок 2.1. Схема відбору кристалічних структур ДНК з бази даних NDB: (а) структури вільної А-і В-ДНК, * – структури, що містять розриви спіралей ДНК або модифіковані основи.



Рисунок 2.1. (продовження). Схема відбору кристалічних структур ДНК з бази даних NDB: (b) ДНК структури з білково-нуклеїнових комплексів; * – структури, що містять розриви спіралей ДНК або модифіковані основи.

Розмір і склад кристалічних структур, обраних для аналізу, показані в таблиці 2.1.

49

		А-ДНК	В-ДНК	Комплекси				
Роздільна здатніс	ть, Å (m ± sd)	$1,6 \pm 0,25$						
Число структур		44	44 54					
Загальне число ну	уклеотидів	506	506 579					
Розмір фрагмен Mir Max Середній (тів ДНК, bp* 1 қ (m ± sd)	4 12 8,5 ± 2,0	4 12 8,9 ± 2,7	$4 \\ 25 \\ 9,7 \pm 5,2$				
Основи, % аденін цитозин гуанін тимін		10 39 41 11	24 22 33 21	27 22 26 25				

Розмір і склад кристалічних структур, обраних для аналізу.

* Для виключення кінцевих ефектів, фланкуючі нуклеотиди були виключені з аналізу

2.2. Вибір структур нуклеосом.

Кристалографічні структури нуклеосом, отримані з високою роздільною здатністю, доступні в базах даних порівняно недавно. Так, найбільш «стара» структура, використана нами при аналізі, отримана в 2000 році. При цьому виявилося, що найкраща дифракційна картинка отримана при використанні паліндромної або симетричної ДНК, яка «відпрацьовує» симетрію гістонового кору.

У даний час такі послідовності отримують на основі природної послідовності альфа-сателітної ДНК. Для побудови паліндромної нуклеосомної ДНК використовується перша частина послідовності альфа-сателітної ДНК, до якої добудовується симетрична друга половина і, потім, другий комплементарний ланцюжок. При цьому сайт зв'язування ферменту *EcoRV*, присутній на початку послідовності альфа-сателітної ДНК, зберігається, а сайт впізнавання ферменту *AluI* замінюється на сайт впізнавання нуклеази EcoRI. Саме таку послідовність ДНК і має більшість нуклеосом, використаних нами для аналізу.

Наше дослідження було проведено на основі координат атомів ДНК з 16 структур нуклеосом, відібраних з бази даних PDB [166], які мають роздільну здатність вищу, ніж 2,60 Å (PDB ID: 1EQZ, 1F66, 1P3I, 1P3L, 1KX3, 2CV5, 2PYO, 1KX5, 1M18, 1M19, 1M1A, 1S32, 1ZLA, 2NQB, 3C1B, 1KX4). Ці структури містять гістонові білки шпорцевої жаби, дрозофіли, людини і курчати (*Xenopus laevis, Drosophila melanogaster, Homo sapiens, Gallus gallus*) і паліндромні фрагменти ДНК довжиною 146 або 147 пар основ, які побудовано на підставі послідовності альфа-сателітної ДНК людини. Нуклеотидний склад 11 нуклеосом з 16 відібраних структур збігається (рис. 2.2). У нуклеосомах 1KX3, 2CV5 відрізняються дві основи, а в нуклеосомі 2PY0, 1KX5 змінені п'ять основ і додано одне, таким чином, послідовність містить не 146, а 147 пар основ. Крім того, структура 1KX4 унікальна: вона містить послідовність, взяту з іншої ділянки альфа-сателітної ДНК.

У нашій базі даних міститься 4072 нуклеотиди, з них 1202 А/Т нуклеотидів і 834 G/C нуклеотидів (співвідношення АТ: GC = 3: 2 або АТ: GC = 60%: 40%).

1EQZ, 1F66, 1P3I, 1P3L, 1M18, 1M19, 1M1A, 1S32, 3C1B, 1ZLA, 2NQB

EcoRV ATCAATATCC ACCTGCAGAT TCTACCAAAA GTGTATTTGG AAACTGCTCC ATCAAAAGGC ATGTTCAGCG <u>GAA</u> TCCGCT GAACATGCCT TTTGATGGAG CAGTTTCCAA ATACACTTTT GGTAGAATCT GCAGGTGGAT ATT<u>GAT</u> EcoRV 10 110 120 130 140 EcoRV

1KX3, 2CV5 <u>ATCAATATCC ACCTGCAGAT TCTACCAAAA GTGTATTTGG AAACTGCTCC ATCAAAAGGC ATGTTCAGCT GAA TTCAGCT GAACATGCCT TTTGATGGAG CAGTTTCCAA ATACACTTTT GGTAGAATCT GCAGGTGGAT ATT<u>GAT</u></u>

2PY0, 1KX5 ATCAATATCC ACCTGCAGAT ACTACCAAAA GTGTATTTGG AAACTGCTCC ATCAAAAGGC ATGTTCAGCT GGA ATCCAGC TGAACATGCC TITTGATGGA GCAGTTTCCA AATACACTTT TGGTAGTATC TGCAGGTGGA TATTGAT

ATCTCCAAAAT ATCCCTTGCG GATCGTAGAA AAAGTGTGTCC AAACTGCGCT ATCAAAGGGA AACTTCAACT GAA TTCAGTT GAAGTTTCCC TTTGATAGCG CAGTTTGACA CACTTTTTCT ACGATCCGCA AGGGATATTT GGAGAT

Рисунок 2.2. Послідовності нуклеосомної ДНК, які використовуються для аналізу.

¹KX4

2.3. Розрахунок структурних параметрів ДНК.

Значення торсійних кутів α (O3'-P-O5'-C5') і γ (O5'-C5'-C4'-C3') цукрофосфатного остову ДНК і фазовий кут псевдообертання (P) цукрового кільця для кожного нуклеотиду розраховувалися за допомогою стандартного пакету програм 3DNA/CompDNA [46].

Значення торсійних кутів α і γ класифікувалися як g+, t, і g (рис.2.3) згідно зі схемою, що має три класичні загальмовані конформації: g+ (60° ± 30°), t (180° ± 30°), g- (300° ± 30°). При цьому, для кута α канонічною вважається g-конформація, а для кута $\gamma - g$ +.

Дезоксирибози були розділені на дві категорії (ріс.2.3б): В-подібні («South», 120° <Р <220°) і А-подібні («North», -60° <Р <60°) [58]. Нуклеотиди з стереохімічно несприятливими значеннями Р поза цими доменами не були включені до аналізу.



Рисунок 2.3. (а) Перемикання між *gauche* +, *gauche*- і *trans* конформаціями кута γ; (б) В-подібна C2'-ендо – («South») і А-подібна C3'-ендо – («North») конформації дезоксирибози.

2.4. Визначення білково-нуклеїнових контактів.

Взаємодія пар атомів у білково-нуклеїнових сайтах впізнавання визначалися за допомогою модифікованого пакету програм, запропонованого в [39], який розрізняє контакти у великому і малому жолобках. Два атоми білка і ДНК вважалися взаємодіючими, якщо відстань між їх центрами була менша ніж 4.5Å [113, 114]. Таким чином ми знаходимо атоми, які взаємодіють за всіма механізмами (водневі зв'язки, електростатичні взаємодії, ван-дер-ваальсові взаємодії) у великому і малому жолобках, без визначення точного типу взаємодії для кожної пари атомів, що утворюють контакти. Нуклеотиди, які містять атоми, що взаємодіють з білком, класифікувалися як взаємодіючі, з наступним розподілом на взаємодіючі в малому і великому жолобках окремо. Нуклеотиди, які не містять атомів, взаємодіючих з білком, визначалися як не взаємодіючі нуклеотиди.

Контакти визначалися для двох груп атомів: 1) атоми основ і 2) атоми цукрофосфатного остову. Для того щоб розрізнити взаємодії атомів цукрофосфатного остову у великому і малому жолобках був використаний спеціальний критерій: визначається положення розглянутого атома білка щодо «поверхні», сформованої чотирма атомами двох сусідніх нуклеотидів: O4'(i), P(i), P(i + 1) та O4'(i + 1) (рис.2.4).



Рисунок 2.4. Схема визначення положення взаємодіючих атомів щодо жолобків подвійної спіралі ДНК. Зеленим кольором позначено атом білка, який взаємодіє з ДНК. Чотири нормальних вектора до площин, які визначаються кожними трьома з чотирьох атомів O4'(i), P(i), P(i + 1) та O4'(i + 1), показані чорними стрілками. Їх векторна сума (червона стрілка) є геометричним центром чотирьох атомів (червоні точки), які визначають площину для визначення положення атома білка щодо ДНК.

У загальному випадку, ці чотири атоми не належать одній площині, тому використовується наступний механізм. Кожні три з цих чотирьох атомів визначають поверхню і відповідний нормальний вектор (чорні стрілки на рис.2.4). Наприклад, нормальний вектор, розташований у P(i) і перпендикулярний до площини, визначається атомами O4'(i), P(i), P(i + 1). Сума цих чотирьох векторів дає «загальний нормальний вектор» **n** (червона стрілка на рис 2.4). Площина, яка перпендикулярна цьому вектору і проходить через геометричний центр чотирьох атомів, розглядається як «площина», що розділяє два жолобки. Якщо проекція атому білка (зелена сфера на рис 2.4) на вектор **n** позитивна, то атом приписується малому жолобку; якщо навпаки, то великим жолобку.

Атоми основ також були розділені на дві групи: експоновані у великий жолобок (N4, N6, N7, O4, O6, C5, C6, C7, C8, і C4 у тиміна і цитозина) і малий жолобок (N2, N3, O2, C2, і C4 у аденіна і гуаніна).

2.5. Обчислення площ доступної поверхні атомів.

Площа доступної поверхні (ПДП) атомів розраховувалася на підставі модернізованого алгоритму Нідо і Go [167].

Для розрахунків молекулу розміщують у віртуальний осередок, сторони якого є сумою сторін куба зі стороною *а*. Молекула має довільну орієнтацію в цьому осередку. Далі простір усередині осередку ділиться на куби зі стороною *а*. Ілюстрація осередків і кубів зображена на рисунку 2.5.

Далі для кожного куба визначається його положення відносно поверхні макромолекули (всередині, зовні або на поверхні). Куби, що знаходяться повністю поза (або всередині) молекули, є зовнішніми (або, відповідно, внутрішніми). Куби, які перетинають поверхню молекули, вважаються поверхневими. Вилучений об'єм молекули може бути апроксимований за допомогою додавання обсягів внутрішніх і половини обсягів поверхневих кубів. Це наближення стає асимптотично вірним при зменшенні величини *а*.



Рисунок 2.5. Зображення осередку, що містить молекулу. Осередок ділиться на куби зі стороною *а*. Далі такі куби діляться на менші для збільшення точності розрахунку.

Радіуси сфер, які утворюють атоми молекули, мають значення порядку 3Å, тому що вони є сумою ван-дер-ваальсових радіусів атома і ефективного радіусу молекули розчинника – води, який приймається рівним 1,4Å. Як стандарт, для значення *a* була обрана довжина 2Å, на першому рівні. Розподіл кубів на менші сегменти відбувається до восьмого рівня, таким чином, що найменший куб має сторону 1,5625•10⁻² Å. Якщо цей куб поверхневий, очікується що його внесок у молекулярний об'єм становить приблизно половину його обсягу. Але точний внесок трохи менше половини обсягу куба через випуклу форму сфери. Для сфери радіусом 3 Å середній внесок дорівнює 0,482 (замість 0,5) від обсягу найменшого куба. Ми використовували це значення як внесок від поверхневого куба на восьмому рівні. Точність обчислення ПДП визначається мінімальним розміром кубу, рівного 1,5625•10⁻² Å, при цьому враховується його внесок у молекулярний об'єм, який дорівнює 0,482.

Отримані значення інваріантні до зміни положення молекули в просторі. Для розрахунків було використано такі радіуси атомів: 1,85Å для C, 1,5Å для N, 1,4Å для O, і 2,0Å для P. Атоми водню не враховувалися при аналізі. Крім того, значення ПДП атомів розраховувалися окремо для великого чи малого жолобка.

Визначення положення атомів ДНК щодо жолобків проходило за тією ж процедурою, що і при визначенні білково-нуклеїнових контактів (див. підрозділ 2.4). Загальна полярна і гідрофобна ПДП для кожного нуклеотиду розраховувалася як сума ПДП атомів ОЗ', О4', О5', О1Р, О2Р, N2, O2, N3, N4, N6, N7, O4, O6, і C1', C2', C3', C4', C5', C4, C5, C6, C8, C7, і C2, відповідно.

2.6. База даних ProtNA-ASA.

На основі розрахованих параметрів була створена доступна в Інтернеті база даних ProtNA-ASA (http://www.protna.bio-page.org.): Protein-Nucleic Acids structural database with information on accessible surface area (ASA) (рис.2.6, [168]).



http://www.protna.bio-page.org/

Рисунок 2.6. Інтерфейс оригінальної бази даних ProtNA-ASA (<u>http://www.protna.bio-page.org</u>.): Protein-Nucleic Acids structural database with information on accessible surface area (ASA).

База даних ProtNA-ASA містить розраховані структурні параметри і ПДП атомів нуклеїнових кислот для негомологічних комплексів ДНК з білками.

2.7. Розрахунок електростатичного потенціалу малого жолобка

2.7.1 База даних кристалографічних структур вільної ДНК для розрахунку електростатичного потенціалу

Для проведення розрахунків електростатичного потенціалу олігонуклеотидів з бази даних NDB [164, 166] були відібрані 70 кристалографічних структур коротких фрагментів вільної В-ДНК, отримані з роздільною здатністю вищою, ніж 2Å (таблиця 2.2). Всі структури містять двоспіральні фрагменти ДНК з немодифікованими основами. Щоб уникнути кінцевих ефектів фланкуючі нуклеотиди були виключені з аналізу. Максимальна довжина аналізованих фрагментів ДНК становила 12 пар основ (34 структури), мінімальна довжина – 6 пар основ (2 структури). Також серед відібраних були олігонуклеотиди, що містять 11 пар нуклеотидів (1 структура), 10 пар нуклеотидів (32 структури) і 9 пар нуклеотидів (1 структура). Структури в сумі містили 830 нуклеотидів або 415 пар нуклеотидів. З них А/Т пари становили 65,4%, G/C пари – 34,6%. Необхідно відзначити, що відібрані для аналізу олігонуклеотиди паліндромні, тобто вони ідентичні в напрямі 5'-3' першого ланцюга та 3'-5' другого ланцюга.

Для проведення статистичного аналізу фрагменти вільної В-ДНК були розділені на групи за нуклеотидним складом їх центрального динуклеотидного кроку (димеру). Існує 10 унікальних динуклеотидних кроків. У відібраних нами 70 структур вільних В-ДНК присутні послідовності з шістьма унікальними центральними димерами: CG, TA, TG, GA, GC і AT. З них групи з TG і GA центральними кроками представлені тільки однією послідовністю (таблиця 2.2).

У кожній з цих груп були відібрані унікальні гексамери, що відрізняються фланкуючими центральний крок динуклеотидами. Ми розглянули 23 унікальні послідовності гексамерів. 14 гексамерів представлені однією структурою, інші 9 представлені двома і більше структурами. Індекси (PDB id) відібраних для аналізу кристалографічних структур коротких фрагментів вільної В-ДНК. PDB id структур, для яких були побудовані залежності розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка, виділені **bold types**.

крок	гексамер	NDB (PDB) ID	крок	гексамер	NDB (PDB) ID
	AACGTT	5DNB , 1EN3 ,		ΤΤΤΑΑΑ	1IKK. 1SK5
		1EN8			,
	AGCGCT	1EN9, 1ENE,		ΤΔΤΔΤΔ	<i>4</i> 73D
	AUCUCI	1ZF5		ΙΛΙΛΙΛ	
	ATCGAT	1D23	TA	ATTAAT	1D49
CG	GACGTC	423D		ACTAGT	bdj061
	CTCGAG	196D, 251D		GTTAAC	1ZF0
	GTCGAC	1ZF7		AGTACT	1D8G
	GCCGGC	1ZFB*		AAATTT	1S2R, 4AH1
	TGGCCA	334D, 126D		ATATAT	1D56, 1D57
		158D		CAATTC	1JTL*, 432D*, 1Z8V*, 1S23,
	AAUCTI	1360		CAATIO	431D
GC					1BNA, 1DOU , 1EHV, 1ENN,
	AGGCCT	1RD1	۸T		1FMS, 1FQ2, 1JGR, 1M6F,
	AUUCCI	IDDI	ΠΙ		1VZK, 1ZFF , 1ZPH, 2B0K,
					2B3E, 2DYW, 2GVR,
				GAATTC	3U08 , 2GYX, 2I2I, 355D,
	GAGCTC	1ZFG			360D, 3U05, 3U0U, 428D,
					442D, 443D,
TG	AATGTT	3BSE			453D, 455D, 463D, 476D,
GA		207D			477D, 4AGZ, 7BNA, 9BNA,
UA	AAUAAA	5070			3U2N, 2QEG

 структури, що містять нуклеотиди з позитивним значенням електростатичного потенціалу.

У гексамерів з центральним АТ кроком (найбільш численна група, 44 структури) виявилися схожі за формою залежності розподілу значень електростатичного потенціалу малого жолобка від положення конкретної пари нуклеотидів щодо центру фрагмента ДНК і/або нуклеотидного складу. Тому для аналізу цієї залежності було обрано 8 гексамерів, які мають 4 різні за нуклеотидним складом послідовності. Для аналізу аналогічної залежності гексамерів GAATTC (35 структур) ми відібрали 3 структури, для яких отримані мінімальне, максимальне і проміжне значення електростатичного потенціалу малого жолобка.

Для послідовностей, що мають нуклеотиди з позитивним значенням електростатичного потенціалу (таблиця 2.2), залежність електростатичного потенціалу малого жолобка від послідовності не будувалися, проте ці послідовності були включені в статистичний аналіз (за винятком нуклеотидів з позитивним значенням електростатичного потенціалу).

Всі пари основ були пронумеровані в обох напрямках, починаючи з центрального положення ± 1 , і наступними ± 2 , ± 3 і т. д. Пара нуклеотидів, яка мала хоча б один з нуклеотидів у альтернативній конформації кута γ в будь-якому з двох комплементарних ланцюгів, розглядалася як пара з альтернативною конформацією. Комплементарна пара динуклеотидів вважалася з альтернативною конформацією кута γ , якщо другий нуклеотид з 5'-кінця будь-якого ланцюга ДНК мав альтернативну конформацію кута γ .

Кількість нуклеотидів з А-подібною конформацією дезоксирибози склало 0,5% всіх досліджуваних нуклеотидів. Число нуклеотидів, що містять альтернативні *trans* (*t*) і *gauche-* (*g-*) конформації кута γ , становило 0,4% і 0,6% від загального числа нуклеотидів (або в перерахунку на пари нуклеотидів – 0,7% і 1,2%).

2.7.2. Розрахунок електростатичного потенціалу малого жолобка.

Розрахунок електростатичних потенціалів малого жолобка проводився за допомогою стандартного програмного пакету DelPhi [169], який базується на вирішенні нелінійного рівняння Пуассона-Больцмана:

$$\nabla \cdot \left[\varepsilon(\vec{r}) \nabla \varphi(\vec{r}) \right] = -\rho^f(\vec{r}) - \sum_i c_i^\infty z_i e_0 \exp\left[\frac{-z_i e_0 \varphi(\vec{r})}{k_B T} \right], \qquad (2.1)$$

де $\varepsilon(\vec{r})$ – проникність навколишнього середовища, φ – електричний потенціал, $\rho^{f}(\vec{r})$ – щільність електричного заряду в середовищі, c_{i}^{∞} – концентрація *i*-го іона на безкінечності (середня концентрація), z_{i} –валентність іону, e_{0} – заряд електрону, k_{B} – постійна Больцмана, T – температура.

Заряди і радіуси атомів були взяті з потенціалу AMBER [170]. Всі обчислення проводилися при 0,145 M Na⁺. Використовувалися наступні значення діелектричних параметрів: внутрішня молекулярна діелектрична стала $\varepsilon = 2$ і діелектрична проникність навколишнього середовища — води $\varepsilon = 80$. Електростатичний потенціал розраховувався в контрольній точці, розташованій поблизу «дна» малого жолобка приблизно в площині пари основ *i* (рис. 2.7). Контрольна точка *i* визначалася як геометричний центр між атомами O4' нуклеотидів *i* + *1* у ланцюзі I (напрямок 5'-3') і нуклеотидів *i*-1 у ланцюзі II (напрямок 3'-5') ДНК. При сильному вигині ДНК у великий жолобок контрольна точка може збігатися з аміногрупою гуаніну, що призводить до великих позитивних значень потенціалу ДНК. Такі пари основ виключалися з статистичного аналізу.



Рисунок 2.7. Визначення точки «збору» потенціалу. Точка $i \in$ геометричним центром між атомами О4' i-1 і i + 1 нуклеотидів.

Для відібраних послідовностей були побудовані графіки залежності електростатичного потенціалу малого жолобка від положення конкретної пари нуклеотидів щодо центру фрагмента ДНК.

Точність обчислення електростатичних потенціалів представлена в опису до програмного пакету DelPhi, згідно з яким точність залежить від розміру сітки поділу простору моделювання: чим більше її розмір, тим вище точність. У наших розрахунках розмір сітки дорівнює 281 і точність отриманих значень електростатичних потенціалів ≈ 10%.

1.2.6. Розрахунок ширини малого жолобка.

Ширина малого жолобка розраховувалася на підставі алгоритму El Hassan and Calladine [171]. Ширина малого жолобка для динуклеотидного кроку **k** розраховувалася як середнє значення двох виділених міжфосфатних відстаней (рис. 2.8) за формулою (2.2):

$$PP_{dist} = \frac{1}{2}((P_{k-2} - P_{k+1}) + (P_{k-1} - P_{k+2}))$$
(2.2)



Рисунок 2.8. Схема, яка пояснює спосіб визначення ширини малого жолобка фрагменту ДНК.

2.8. Розрахунок матриць подібності.

Для визначення залежності форми кривих електростатичного потенціалу малого жолобка від структури і послідовності ДНК були розраховані матриці

подібності (матриці міжоб'єктних відстаней), засновані на евклідових відстанях, згідно з формулою (2.3):

$$\rho_E(x_i, x_j) = \sqrt{\sum_{l=1}^k (x_{il} - x_{jl})^2}, \qquad (2.3)$$

де x_{il} , x_{jl} — значення l-ої ознаки у i-го (j-го) об'єкту (l = 1, 2, ..., k, i, j = 1, 2, ..., n).

Евклідові відстані відображають міру подібності об'єктів між собою. Ця міра є геометричною відстанню в багатовимірному просторі. Кожну криву електростатичного потенціалу можна уявити точкою *i* в багатовимірному просторі. Її схожість з іншими кривими буде визначатися як відповідна відстань між різними точками *i*. Для тотожних кривих евклідова відстань дорівнюватиме 0. Чим більша відстань, тим більше розрізняються об'єкти.

Такий підхід дозволив нам порівняти форму електростатичного потенціалу малого жолобка для однакових послідовностей і послідовностей, які розрізняються, в межах виділених груп.

РОЗДІЛ З

КОНФОРМАЦІЙНА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ КОРОТКИХ ФРАГМЕНТІВ ВІЛЬНОЇ ДНК

У Розділі 3 «Конформаційна варіабельність цукрофосфатного остову коротких фрагментів вільної ДНК» наведені результати вивчення структурних особливостей цукрофосфатного остову коротких фрагментів вільної ДНК, отриманих методом РСА, і розрахунку їх електростатичного потенціалу. Як відомо, для вільної ДНК властиві ті ж структурні зміни, що і для ДНК у складі специфічних комплексів з білками [59,160], тому дослідження конформаційних особливостей вільної В-ДНК важливо для розуміння механізмів білковонуклеїнового впізнавання.

Аналіз кристалографічних структур ДНК дозволив визначити для олігонуклеотидів вільної А- і В-ДНК (1) кількість нуклеотидів з класичною та альтернативними конформаціями кута γ , (2) площі доступної поверхні (ПДП) полярних і неполярних атомів нуклеотидів і її зміна в залежності від конформації кута γ , (3) полярність малого і великого жолобків і її залежність від конформації кута γ , (4) обчислити електростатичний потенціал олігонуклеотидів і вплив структурних перебудов цукрофосфатного остову на розподіл електростатичного потенціалу в малому жолобку коротких фрагментів вільної ДНК.

3.1. Сиквенс-специфічні переходи торсійного кута у цукрофосфатного остову коротких фрагментів вільної ДНК.

На першому етапі було проведено статистичний аналіз бази даних олігонуклеотидів вільної А- і В-ДНК (див. підрозділ 2.1, рис.2.1) та визначено кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ в розглянутих структурах (таблиця 3.1). Згідно з отриманими результатами нуклеотиди вільної ДНК мають переважно канонічну g+ конформацію кута γ , відсоток нуклеотидів з альтернативними невеликий (12,8% і 1% у А-ДНК і В-ДНК, відповідно).

63

Форма ДНК	А-ДНК		в-ДНК			
кут ү	g+	t	g+	g-	t	
середнє	87,2	12,8	99,0	0,8	0,2	
А	71,4	28,6	100,0	0,0	0,0	
С	98,5	1,5	97,6	2,4	0,0	
G	76,7	23,3	100,0	0,0	0,0	
Т	100,0	0,0	97,6	1,6	0,8	

Кількість різних конформацій кута ү (у %) у фрагментів вільної ДНК для всіх типів нуклеотидів

Більш високий відсоток нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ спостерігається у нуклеотидів вільної А-ДНК, для яких виявлена тільки одна з двох можливих альтернативних конформацій – t конформація. Нуклеотиди з В-подібною конформацією дезоксирибози приймають обидві (g- і t) альтернативні конформації. Можливо, існують деякі стеричні обмеження для реалізації альтернативної конформації g- у нуклеотидів з А-подібною конформацією дезоксирибози.

Результати, представлені в таблиці 3.1, дозволяють зробити ще один важливий висновок щодо сиквенс-специфічності зафіксованих перемикань конформації кута γ . Для А-ДНК перехід з класичної g+ конформації в альтернативну t конформацію кута γ більш притаманий для нуклеотидів, що містять аденін і гуанін (28,6% і 23,3% відповідно). А-подібні нуклеотиди, що містять тимін, мають тільки класичну g+ конформацію кута γ .

Для вільної В-ДНК альтернативна *t* конформація кута *γ* присутня тільки у нуклеотидів, що містять тимін. Альтернативна *g*- конформація виявлена у нуклеотидів, що містять піримідини – тимін і цитозин. Для нуклеотидів, які містять пурини, не виявлено альтернативних конформацій кута *γ*.

Аналіз положення альтернативних конформацій кута у в обох ланцюгах ДНК показав, що для вільної А-ДНК властива кооперативність переходів кута у в

альтернативну *t* конформацію: в одній структурі А-ДНК міститься кілька нуклеотидів з альтернативною *t* конформацією кута γ. У В-ДНК, навпаки, нуклеотиди з *t* конформацією кута γ ізольовані (таблиця 3.2, рис.3.1).

Таблиця 3.2.

Число А- і В-подібних фрагментів вільної ДНК, які мають певну кількість (у %) нуклеотидів з альтернативною конформацією кута γ.

Ν	96					
	А-подібні	В-подібні				
N1	44					
кут ү	t	t	t & g-			
N2						
0 %	19	51	49	48		
1 – 10 %	5	1	2	3		
11 - 20 %	16	-	1	1		
21 - 30 %	-	-	-	-		
31 - 40 %	-	-	-	-		
41 – 50 %	4	-	-	-		
51 - 60 %	-	-	-	-		
61 – 70 %	-	-	-	-		
71 - 80 %	-	-	-	-		
81 - 90 %	-	-	-	_		
91 - 100 %	-	-	-	-		

N – повне число структур ДНК; N1 – число структур ДНК, які містять нуклеотиди з різною конформацією дезоксирибози; N2 – відсоток нуклеотидів з певною альтернативною конформацією кута γ від загального числа нуклеотидів з однаковою конформацією дезоксирибози в складі однієї структури ДНК.



Рисунок 3.1. Приклад структур вільної ДНК з різною кількістю нуклеотидів, які мають альтернативну t конформацію кута γ (жовтий колір); наведено PDB id структур.

3.2. Площа доступної поверхні атомів коротких фрагментів ДНК у великому і малому жолобках.

У цьому підрозділі проведено аналіз ПДП полярних і неполярних атомів вільної А- і В-ДНК. За допомогою алгоритму (див. підрозділ 2.5) були розраховані ПДП кожного атому олігонуклеотидів ДНК, експонованих у малий і великий жолобки. На підставі цих даних визначено загальну полярну і гідрофобну ПДП нуклеотидів, і окремо – полярну і гідрофобну ПДП атомів цукрофосфатного остову і основ.

3.2.1. ПДП атомів коротких фрагментів ДНК і полярність жолобків.

Середні значення ПДП полярних і гідрофобних атомів для кожного з чотирьох типів нуклеотидів з різними конформаціями кута γ наведені в таблиці 3.3, співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів та приклад візуалізації поверхонь однакової послідовності трьох структур вільної ДНК, які містять нуклеотиди з різними конформаціями кута γ, показані на рисунку 3.2.

З рисунку 3.1 видно, що нуклеотиди з класичною *g*+ конформацією кута γ і обома упаковками дезоксирибози мають співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів, більше 1 у великому жолобку і менше 1 в малому жолобку. Нуклеотиди, що містять пурини, особливо для А-ДНК, мають більш високе співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів у великому жолобку, завдяки великим значенням ПДП полярних атомів основ (аденіну і гуаніну), і великим значенням ПДП гідрофобних атомів цитозину і тиміну (таблиця 3.3).

Перехід в альтернативні конформації кута у викликає значні зміни полярногідрофобного профілю обох жолобків.

У малому жолобку перехід кута γ в альтернативні t і g- конформації призводить до збільшення співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів (співвідношення стає більше 1) завдяки одночасному збільшенню абсолютних значень ПДП полярних і зменшення ПДП гідрофобних атомів цукрофосфатного остову ДНК. У середньому, це співвідношення збільшується в 2,4 рази для

нуклеотидів з альтернативною *g*- конформацією кута γ для В-ДНК і в 2 рази для нуклеотидів з альтернативною *t* конформацією кута γ і з будь-якою упаковкою дезоксирибози (і А-, і В-подібною).

Таблиця 3.3

Абсолютні значення ПДП (в Å ²) полярних і гідрофобних атомів,
експонованих в малий і великий жолобки, для всіх типів нуклеотидів з А- і
В-подібною упаковками дезоксирибози і різними конформаціями кута у

Форма ДНК	А-ДНК				В-ДНК					
жолобк и	вели	великий малий		великий			малий			
γ	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	g-	t	<i>g</i> +	g-	t
			IJ	(укрофо	сфатниі	й остов				
Полярна ПДП										
середнє	42,5	38,6	34,9	46,8	48,7	49,1	24,9	33,5	49,5	70,5
А	42,9	40,4	34,5	47,9	49,9	-	-	31,4	-	-
С	41,8	38,9	35,1	42,5	49,6	44,1	-	32,5	53,9	-
G	44,6	38,1	34,4	46,8	46,6	-	-	35,9	-	-
Т	38,7	-	36,3	-	49,8	56,6	24,9	32,9	43,0	70,5
	Гідро				фобна Г	ІДП				
середнє	0,3	8,9	57,2	41,5	12,6	11,8	29,6	43,2	23,3	20,6
А	0,1	9,2	57,8	45,7	11,3	-	-	46,0	-	-
С	0,3	9,0	56,6	37,2	12,2	11,0	-	41,8	24,3	-
G	0,4	8,8	57,3	40,7	14,7	-	-	44,8	-	-
Т	0,1	-	58,7	-	11,2	12,9	29,6	39,0	21,8	20,6
	Основи									
				Поля	ярна ПД	ĮП				
середнє	13,0	17,6	8,7	9,3	11,3	4,6	4,6	7,0	5,1	2,5
А	13,0	15,7	4,5	3,6	15,9	-	-	3,2	-	-
С	12,6	13,7	5,2	3,2	7,5	6,4	-	4,5	4,9	-
G	15,2	18,3	14,1	11,2	14,0	-	-	13,3	-	-
Т	7,4	-	7,3	-	5,7	2,0	4,6	3,9	5,4	2,5
				Гідро	фобна Г	ІДП				
середнє	11,1	8,7	0,5	1,0	18,3	26,3	39,8	0,9	0,0	0,0
А	2,4	7,0	5,5	4,5	8,1	-	-	3,5	-	-
С	13,5	23,9	0,0	0,0	19,9	20,4	_	0,0	0,0	-
G	3,9	8,3	0,3	0,1	10,9	-	-	0,3	_	-
Т	30,1	-	0,0	-	39,9	35,1	39,8	0,0	0,0	0,0

У великому жолобку, перехід $g + \to t$ кута γ викликає протилежний ефект: одночасні зміни абсолютних значень полярної і гідрофобної ПДП атомів

цукрофосфатного остову ДНК призводять до зменшення співвідношення полярної/гідрофобної поверхонь атомів в 1,8 і 2 рази для В-ДНК і А-ДНК, відповідно.



Рисунок 3.2. Полярно/гідрофобна поверхня: (а) співвідношення середньої полярної/гідрофобної ПДП атомів нуклеотидів в різних жолобках вільної А- і В-ДНК, планки похибок відображають стандартне відхилення; (б) поверхня послідовності ТАG для трьох різних олігонуклеотидів (наведено PDB id структур); нуклеотиди, які містять аденін, мають різні конформації кута γ.

У великому жолобку найбільш значні зміни у А-ДНК спостерігаються при переходах кута γ з класичної g+ конформації кута γ в альтернативну t конформацію нуклеотидів, що містять аденін і гуанін. Для нуклеотидів, що містять аденін,

співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів зменшується в 6,5 разів, а в для нуклеотидів, що містять гуанін, – в 4,2 рази.

Для вільної В-ДНК перехід $g + \rightarrow g$ - викликає значне збільшення співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів у малому жолобку і зменшення – у великому жолобку в результаті збільшення ПДП полярних атомів цукрофосфатного остову нуклеотидів, що містять піримідини, оскільки у нуклеотидів, що містять пурини, переходи в альтернативні конформації кута γ не виявлено. Одночасно зменшується ПДП гідрофобних атомів цукрофосфатного остову (таблиця 3.3).

Також як у класичній g+ конформації, А-подібні нуклеотиди з альтернативною t конформацією кута γ , що містять пурини, мають більш високі значення співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів у великому жолобку, ніж нуклеотиди, що містять піримідини. Це відбувається через відмінності ПДП полярних і гідрофобних атомів основ. При цьому максимальну ПДП полярних атомів в обох жолобках мають нуклеотиди з будь-якою конформацією кута γ , які містять гуанін.

3.2.2. ПДП атомів ОЗ', О5', С5' цукрофосфатного остову.

На додаток до розрахунків загальної ПДП нуклеотидів, нами детально досліджено зміни ПДП трьох атомів цукрофосфатного остову олігонуклеотидів вільної ДНК: полярних атомів ОЗ', О5' і гідрофобного С5'. Згідно з нашими даними ці атоми часто беруть участь у формуванні контактів з атомами бічних груп білків при утворенні білково-нуклеїнових комплексів.

Середні значення ПДП атомів, розраховані для всіх чотирьох типів нуклеотидів з різними конформаціями кута *γ*, наведено в таблиці 3.4.

Атом ОЗ' експонований у малий жолобок і для А-подібних, і для В-подібних нуклеотидів з будь-якою конформацією кута γ. У нуклеотидів з А-подібною упаковкою дезоксирибози і класичною *g*+ конформацією кута γ ПДП ОЗ' атома вище, ніж у нуклеотидів з В-подібною упаковкою дезоксирибози. Переходи в *t* і *g*-конформації призводять до збільшення ПДП ОЗ' атома у малому жолобку.

Найбільша ПДП ОЗ' атома в малому жолобку зафіксована у нуклеотидів з *t* конформацією кута γ і А-подібною конформацією дезоксирибози, що містять гуанін.

Таблиця 3.4

Форма ДНК	А-ДНК				В-ДНК						
жолобок	вел	икий	ма	лий		великий			малий		
γ	g+	t	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	<i>g</i> -	t	g+	<i>g</i> -	t	
03'											
повна	0,2	0,1	5,3	6,2	0,0	0,0	0,0	3,0	5,1	4,0	
А	0,1	0,1	5,6	6,3	0,0	-	-	3,7	-	-	
С	0,2	0,0	5,4	5,8	0,0	0,0	-	2,7	3,2	-	
G	0,2	0,1	5,2	6,3	0,0	-	-	2,5	-	-	
Т	0,1	-	5,5	-	0,0	0,0	0,0	3,2	7,9	4,0	
O5′											
повна	0,2	0,0	0,0	4,0	0,7	2,4	0,0	0,1	2,5	2,1	
А	0,1	0,0	0,0	4,5	0,7	-	-	0,0	-	-	
С	0,2	0,0	0,0	4,2	0,7	1,5	-	0,1	2,8	-	
G	0,2	0,0	0,0	3,8	0,7	-	-	0,1	-	-	
Т	0,1	-	0,0	-	0,5	3,6	0,0	0,0	2,1	2,1	
C5′											
повна	0,1	8,6	22,3	7,2	0,2	1,8	14,4	24,0	2,5	3,8	
А	0,00	9,0	22,8	7,7	0,2	-	-	24,1	-	-	
С	0,1	8,8	22,2	6,3	0,2	1,4	-	23,6	3,7	-	
G	0,1	8,4	22,1	7,1	0,2	-	-	25,3	-	-	
Т	0,0	-	22,7	-	0,1	2,4	14,4	22,3	0,6	3,8	

Середні значення ПДП атомів ОЗ', О5' і С5'для нуклеотидів вільної А- і В-ДНК з різними конформаціями кута γ у великому і малому жолобках.

Атом О5' для А-подібних нуклеотидів з класичною g+ конформацією кута γ практично не експонований ні в один з жолобків. У нуклеотидів з класичною g+ конформацією кута γ і В-подібною упаковкою дезоксирибози, атом О5' також має дуже малу ПДП в обох жолобках, але у великому жолобку ПДП трохи вище.

Найбільш значна зміна ПДП атомів О5' спостерігається в малому жолобку при переході А-подібних нуклеотидів, що містять аденін, у *t* конформацію кута γ . Для В-ДНК спостерігається збільшення ПДП атому О5' у великому жолобку при

переході в g- конформацію кута γ , а в малому жолобку — при переході в будь-яку альтернативну конформацію кута γ .

Найбільші значення ПДП атома О5' спостерігаються у нуклеотидів з Аподібною конформацією дезоксирибози і *t* конформацією кута γ, що містять аденін і цитозин.

Атом C5' експонований у малий жолобок для всіх нуклеотидів з класичною конформацією *g*+ кута γ і будь-який упаковкою дезоксирибози. При перемиканні в альтернативні конформації кута γ його ПДП зменшується в малому жолобку для всіх нуклеотидів незалежно від конформації дезоксирибози.

У великому жолобку ПДП атому С5' істотно збільшується при переході в альтернативну t конформацію кута γ незалежно від упаковки дезоксирибози, і в значно меншій мірі — при переході в g- конформацію кута γ для В-ДНК. Максимальне збільшення ПДП атома С5' спостерігається у А-подібних нуклеотидів, що містять аденін, при переході в альтернативну t конформацію.

Таким чином, при зміні конформації кута γ відбувається зміна доступності атомів цукрофосфатного остову, яка в значній мірі визначає полярність жолобків і можливість реалізації контактів атомних груп білків з цукрофосфатним остовом у білково-нуклеїнових комплексах. Необхідно також відзначити, що зафіксовані зміни ПДП розглянутих атомів сиквенс-специфічні.

3.3. Обчислення і аналіз розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка олігонуклеотидів вільної ДНК.

конформації цукрофосфатного Для дослідження впливу остову на електростатичний потенціал малого жолобка коротких фрагментів вільної ДНК були визначені: (1) кількість нуклеотидів 3 класичною альтернативними та конформаціями кута у коротких фрагментів вільної В-ДНК з відповідної бази даних кристалографічних структур (див. підрозділ 2.7.1); (2) зміни розмірів малого жолобка, величини і розподіл електростатичного потенціалу малого жолобка в залежності від конформації цукрофосфатного остову; (3) сиквенс-специфічність цих параметрів малого жолобка коротких фрагментів вільної В-ДНК.

3.3.1. Загальний статистичний аналіз значень і розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка

Аналіз середніх значень електростатичного потенціалу і ширини малого жолобка в залежності від положення пари основ щодо центру фрагмента вільної В-ДНК, показав, що електростатичний потенціал на кінцях коротких фрагментів ДНК зменшується (за абсолютною величиною) приблизно в 2,5 рази, при цьому ширина малого жолобка збільшується на 10% (близько 1 Å) (рис. 3.3а). Цей факт можна пояснити одним з передбачуваних ефектів: (1) розкручуванням вільних кінців коротких олігонуклеотидів (при цьому величина кута розкручування – Twist - часто корелює з шириною малого жолобка; (2) наявністю видалених негативно заряджених фосфатних груп, «обрізання» яких може істотно впливати на значення електростатичного потенціалу жолобка центральній малого V частині олігонуклеотидів.

Для з'ясування причини зафіксованого зменшення (по абсолютній величині) електростатичного потенціалу малого жолобка в положеннях кінцевих нуклеотидів були обчислені значення кутів Twist для декількох структур. Отримані середні значення кута розкручування виявилися близькими до його значення для класичної подвійної спіралі В-форми: ми отримали значення Twist $\approx 33,4 \pm 4,8^{\circ}$, тоді як середнє значення Twist для В-ДНК складає 36°. Очевидно, для пояснення зменшення електронегативності малого жолобка, що спостерігається, необхідно розглянути інший механізм, а саме, «обрізання» негативно заряджених фосфатних груп кінцевих нуклеотидів при формуванні коротких фрагментів ДНК.





Рисунок 3.3. Електростатичний потенціал та ширина малого жолобка олігонуклеотидів вільної ДНК: (а) середні значення електростатичного потенціалу (kT/e) і ширини малого жолобка в залежності від положення нуклеотиду; (б) розподіл електростатичного потенціалу АТ пар нуклеотидів з різними конформаціями торсійного кута γ (наведено PDB ід візуалізованих структур).

Щоб оцінити вплив кінцевих ефектів на величину електростатичного потенціалу малого жолобка були розраховані його значення для олігонуклеотидів В-ДНК різної довжини (рис.3.4, таблиця 3.5). Ми проаналізували отримані дані і порівняли їх з результатами отриманими для фрагментів ДНК з нашої бази даних, що містять олігонуклеотиди довжиною 12, 11, 10, 9 і 6 пар нуклеотидів.
Структури, що містять більше 8 пар нуклеотидів, складають у нашій базі даних таку відносну кількість: 12 bp – 48,6%; 10 bp – 45,7%; 11 bp і 9 bp – 1,4%.



Рисунок 3.4 Залежність електростатичного потенціалу малого жолобка від довжини олігонуклеотидів В-ДНК; «×»визначає кінці укорочених фрагментів ДНК.

Якщо розглянути гексамери (цей розмір фрагмента вільної ДНК був обраний нами для проведення дослідження впливу конформації цукрофосфатного остову і послідовності на електростатичний потенціал малого жолобка), то вплив «відрізаних» негативно заряджених фосфатних груп на значення потенціалу нуклеотидів у положенні ± 3 не перевищує -0,6 kT/e (таблиця 3.5).

Таким чином, можна стверджувати, що для кожної структури, відібраної нами для досліджень і яка містить більше 9 пар основ, можна використовувати тільки її центральний гексамер. Такого розміру олігонуклеотида досить для того, щоб уникнути впливу кінцевих ефектів у фрагментах з початковою довжиною 9 пар нуклеотидів і більше. Ми також можемо знехтувати впливом кінцевих ефектів «відрізаних» фосфатних груп на величину електростатичного потенціалу термінальних нуклеотидів у структур, що містять 6 пар нуклеотидів. Для таких структур кінцевий ефект не перевищує ≈ -1,6 kT/e, але в нашій базі тільки 2 структури, що містять 6 пар нуклеотидів, і для цих структур не зафіксовані конформаційні перебудови кута γ.

Таблиця 3.5

Значення електростатичного потенціалу малого жолобка (EP, kT/e) для олігонуклеотидів В-ДНК різної довжини.

Довжина (bp) N bp,	32	26(-8)	18(-16)	14(-20)	12(-24)	положення	$\frac{EP_{32 \text{ bp}}}{-EP_{12 \text{ bp}}}$
ланцюг І							
A2	-6,0	-0,5	-0,1	-0,0	-0,0	+16	
A3	-7,0	-0,9	-0,1	-0,1	-0,0	+15	
A4	-7,0	-1,7	-0,2	-0,1	-0,0	+14	
C5	-6,1	-2,5	-0,3	-0,1	-0,1	+13	
C6	-5,9	-4,2	-0,6	-0,2	-0,1	+12	
C7	-6,1	-5,6	-1,0	-0,3	-0,1	+11	
C8	-6,4	-6,2	-2,0	-0,6	-0,2	+10	
C9	-6,6	-6,6	-3,0	-1,1	-0,3	+9	
A10	-7,7	-7,7	-6,2	-2,2	-0,6	+8	
A11	-7,5	-7,5	-7,1	-3,9	-1,0	+7	
A12	-7,5	-7,5	-7,4	-6,0	-2,2	+6	
A13	-7,4	-7,4	-7,4	-7,	-3,7	+5	-3,7
A14	-7,1	-7,1	-7,0	-6,9	-5,5	+4	-1,6
C15	-6,2	-6,2	-6,1	-6,1	-5,6	+3	-0,6
C16	-5,9	-5,9	-5,9	-5,9	-5,7	+2	-0,2
C17	-6,1	-6,1	-6,1	-6,1	-6,1	+1	-0,1
C18	-6,4	-6,4	-6,4	-6,4	-6,3	-1	-0,1
C19	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	-6,4	-2	-0,2
A20	-7,7	-7,7	-7,7	-7,7	-7,2	-3	-0,5
A21	-7,6	-7,5	-7,5	-7,4	-5,9	-4	-1,6
A22	-7,5	-7,5	-7,5	-7,1	-3,6	-5	-3,9
A23	-7,5	-7,5	-7,3	-5,9	-2,0	-6	
A24	-7,1	-7,1	-6,6	-3,6	-1,0	-7	
C25	-6,2	-6,2	-4,4	-2,0	-0,6	-8	
C26	-6,0	-5,9	-2,4	-1,0	-0,3	-9	
C27	-6,2	-5,9	-2,0	-0,7	-0,2	-10	
C28	-6,4	-5,7	-1,0	-0,3	-0,1	-11	
C29	-6,6	-4,7	-0,6	-0,2	-0,1	-12	
A30	-7,7	-3,7	-0,3	-0,1	-0,1	-13	
A31	-7,4	-2,0	-0,2	-0,1	-0,0	-14	
A32	-7,0	-1,0	-0,1	-0,1	-0,0	-15	
A33	-5,9	-0,6	-0,1	-0,0	-0,0	-16	

Аналіз сиквенс-специфічності значень потенціалу ДНК в малому жолобку показав, що А/Т пари нуклеотидів характеризуються більшою електронегативністю в малому жолобку, ніж G/C пари, що узгоджується з літературними даними [97,148,173].

3.3.2. Зміна електростатичного потенціалу малого жолобка в залежності від конформації кута γ

Переходи кута γ з канонічної g+ конформації в альтернативну t конформацію, які виявлені тільки у А/Т нуклеотидів, призводять до збільшення (за абсолютними значеннями) негативного електростатичного потенціалу (таблиця 3.6, рис.3.3б).

Таблиця 3.6

Середні значення електростатичного потенціалу (kT/e) і ширини (Å) малого жолобка для А/Т і G/C пар нуклеотидів з різними конформаціями цукрофосфатного остову: конформації кута γ (g+, g-, t) і дезоксирибози (В-подібна (В) і А-подібна (А)). У дужках наведені середні значення ширини малого жолобка (м.ж.) для пар нуклеотидів (А/Т або G/C) у певних положеннях щодо центру гексамерів.

		A/T	G/C			
положення	потенціал	ширина м.ж.	потенціал	ширина м.ж.		
		, B				
±1	-9,4	10,4	-5,5	11,2		
±2	-8,4	10,3	-5,4	11,7		
±3	3 -6,8 11,2 -5,8		-5,8	12,7		
		<i>t</i> , B				
±2	-10,0	9,3 (10,6)	-	-		
		g- ,	, B			
±1			-5,1	11,9 (11,7)		
±2	-6,6	12,3 (11,25)				
±3			-4,8	14,4 (13,4)		
		<i>g</i> +,	, A			
±2	-8,5	9,6 (10,0)	-5,5	11,2 (11,5)		

Раніше ми отримали, що для В-подібної ДНК при переході кута γ в *t* конформацію ПДП полярних атомів цукрофосфатного остову збільшується у малому жолобку з 33,5 Å² до 70,5 Å², а гідрофобна ПДП зменшується з 43,2 Å² до 20,6 Å² (таблиця 3.3), що призводить до істотного збільшення полярності малого жолобка.

Крім того, збільшення електронегативності малого жолобка у сайтах локалізації таких «перемкнених» нуклеотидів можна пояснити і змінами ширини малого жолобка. Дійсно, виконаний нами розрахунок середніх значень ширини малого жолобка для вільної В-ДНК показав, що при переході нуклеотидів в альтернативну *t* конформацію кута γ середня ширина малого жолобка зменшується у порівнянні з його шириною в місцях локалізації нуклеотидів з класичної *g*+ конформацією кута γ (таблиця 3.6, рис.3.2б).

Перехід в альтернативну g- конформацію, навпаки, призводить до зменшення (за абсолютними значеннями) негативного електростатичного потенціалу і для А/Т, і — в меншій мірі — для G/C пар нуклеотидів (таблиця 3.6, рис.3.26). Ймовірно, зафіксоване нами зменшення електронегативності малого жолобка в цьому випадку викликано збільшенням його ширини. Аналіз середніх розмірів малого жолобка в місцях розташування нуклеотидів з g- конформацією кута γ показав, що середня ширина малого жолобка збільшується (таблиця 3.6). Тобто, зменшення електронегативності малого жолобка при наявності нуклеотидів з g- конформацією кута γ викликано збільшенням ширини малого жолобка.

В→А перехід дезоксирибози не призводить до суттєвих змін значень електростатичного потенціалу малого жолобка ні для А/Т, ні для G/C пар нуклеотидів, хоча для А/Т пар нуклеотидів отримано зменшення ширини малого жолобка в порівнянні з його розмірами для В-подібної конформації дезоксирибози (таблиця 3.6).

3.3.3. Розподіл електростатичного потенціалу олігомерів у малому жолобку.

Для більш детального дослідження сиквенс-специфічності розподілу електростатичного потенціалу в малому жолобку для шести груп гексамерів (див. підрозділ 2.7.1 та таблиця 2.2) були побудовані залежності величини потенціалу від положення пари нуклеотидів у ланцюгу щодо центру фрагмента ДНК (положення 1, -1 визначає дві центральні пари нуклеотидів – центральний динуклеотидний крок), і розрахували їх матриці подібності, засновані на аналізі евклідових відстаней.

СG крок. Аналіз розподілу електростатичного потенціалу гексамерів, у складі яких присутній центральний CG крок, вказує на схожість форми електростатичного потенціалу, яка не залежить від послідовності фланкуючих нуклеотидів (рис. 3.5а). Коефіцієнт подібності для цих гексамерів ≤ 3 (рис. 3.5б).

Тобто, вплив нуклеотидного складу на величину і розподіл електростатичного потенціалу в малому жолобку для гексамерів цієї групи несуттєвий. Але, згідно з літературними даними [82], тетрамери хСGх мають високу схильність до деформації.



Рисунок 3.5. а) Залежність електростатичного потенціалу від положення нуклеотиду для послідовностей з центральним СG кроком, положення -1, 1 визначає дві центральні комплементарні пари нуклеотидів; б) матриця подібності для гексамерів з центральним CG кроком.

Імовірно, для гексамерів з гнучкими центральними тетрамерами хСGх вплив фланкуючих основ на значення і форму розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка несуттєвий порівняно з їх впливом на конформаційну рухливість таких послідовностей.

Винятком є послідовність $d(ATCGAT)_2$, яка містить найбільш жорсткі фланкуючі AT кроки. Ці жорсткі динуклеотиди на кінцях даного фрагменту призводять до звуження малого жолобка до 9,7Å і 9,8 Å (ширина малого жолобка в центрі фрагмента 13,1 Å), і, як наслідок, до збільшення (по абсолютній величині) електронегативного потенціалу малого жолобка.

У гексамерів цієї групи не виявлено нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ.

GC крок. Форма розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка у послідовностей з жорстким центральним GC кроком розрізняється незначно, але в більшій мірі, ніж для послідовностей з центральним CG кроком (рис. 3.6): послідовності цієї групи мають середній електростатичний потенціал -5,76 ± 1,76 kT/e.



Рисунок 3.6. а) Залежність електростатичного потенціалу від положення нуклеотиду для послідовностей з центральним GC кроком, положення -1, 1 визначає дві центральні комплементарні пари нуклеотидів; позначені положення нуклеотидів з альтернативними *gauche*- конформаціями кута γ : *g*- (I) в ланцюгу I і *g*- (II) в ланцюгу II; б) матриця подібності для гексамерів з центральним GC кроком, нуклеотиди з альтернативними *g*- конформаціями кута γ підкреслені у відповідних послідовностях.

Необхідно відзначити, що здатність до деформації хGCx тетрануклеотидів у найменшій мірі залежить від фланкуючих нуклеотидів у порівнянні з іншими тетрамерами з центральним пурин-пірімідиновим кроком [82]. Тобто, тетрануклеотиди xGCx є «жорсткими» і за структурою, і за формою розподілу електростатичного потенціалу в малому жолобку.

Максимальна схожість форми розподілу значень електростатичного потенціалу малого жолобка (мінімальний коефіцієнт подібності) в цій групі мають гексамери d(AAGCTT)₂ i d(AGGCCT)₂ (рис. 3.6б). Мінімальна схожість (максимальні коефіцієнти подібності) отримано для d(G<u>A</u>GC<u>T</u>C)₂ i d(TG<u>G</u>CCA)₂ (підкреслені, рис. 3.6б), які мають нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ (рис. 3.6а).

Пари нуклеотидів з альтернативною *g*- конформацією кута γ (підкреслені у d(G<u>A</u>GC<u>T</u>C)₂) мають більш негативний електростатичний потенціал малого жолобка. Такі значення електростатичного потенціалу можуть бути пояснені двома ефектами: зміною (1) ширини малого жолобка або (2) ПДП полярних атомів цукрофосфатного остову ДНК. Ширина малого жолобка в місцях локалізації нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ становить 12,4 Å і 12,3 Å (для -2 і 2 позицій в гексамері d(G<u>A</u>GC<u>T</u>C)₂ відповідно). Ці значення більші, ніж ширина малого жолобка В-ДНК.

Отже, збільшення електронегативності малого жолобка в цьому випадку не можна пояснити зміною його ширини.

Відносне збільшення електронегативності малого жолобка в місцях локалізації А/Т пар з альтернативною *g*- конформацією кута γ для послідовності з центральним GC кроком можна пояснити різницею ПДП атомів, експонованих у малий жолобок для А/Т і G/C пар нуклеотидів.

Гексамер d(TGGCCA)₂ представлений двома структурами, які відрізняються формою розподілу електростатичного потенціалу (рис.3.6). Ці структури мають різні конформації кута γ : в одній з послідовностей є пара нуклеотидів з *g*-конформацією кута γ (підкреслена: d(TG<u>G</u>CCA)₂). Такий нуклеотид має більше (по абсолютній величині, рис.3.6) середнє значення електростатичного потенціалу, що і

є причиною зміни форми розподілу потенціалу в малому жолобку гексамера d(TG<u>G</u>CCA)₂.

ТА крок. Послідовність, що містить центральний ТА крок, має великий розкид значень електростатичного потенціалу в малому жолобку (рис. 3.7а).

Відомо, що, тетрануклеотиди хТАх (особливо ТТАА) дуже гнучкі [82]. Дійсно, згідно з отриманими результатами (рис. 3.7а), розподіл електростатичного потенціалу малого жолобка у фрагментів з центральним ТА кроком істотно залежить від нуклеотидного складу фланкуючих основ.



Рисунок 3.7. а) Залежність електростатичного потенціалу від положення нуклеотиду для послідовностей з центральним ТА кроком положення (-1, 1) показує дві центральні пари нуклеотидів; позначені положення нуклеотидів з альтернативними *trans* конформаціями кута γ : *t* (I) у ланцюгу I і *t* (II) у ланцюгу II; б) матриця подібності для гексамерів з центральним ТА кроком, нуклеотиди з альтернативними *t* конформаціями кута γ підкреслені у відповідних послідовностях.

Перемикання кута γ з класичної g+ конформації в альтернативну t конформацію для комплементарної пари нуклеотидів у гексамерів $d(A\underline{T}TAAT)_2$ і двох комплементарних пар нуклеотидів гексамеру $d(T\underline{T}TA\underline{A}A)_2$ призводить до істотно різних форм розподілу потенціалу (рис.3.7б). Основною причиною такої зміни профілю електростатичного потенціалу ϵ збільшення (по абсолютній

величині) значень потенціалів у місцях локалізації комплементарних пар нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ . Для гексамеру d(TTTA<u>A</u>A)₂ в сайті локалізації таких нуклеотидів (положення 2) ширина малого жолобка зменшується до 8,5Å, і це призводить до істотного збільшення (по абсолютній величині) електростатичного потенціалу (рис.3.7).

У той же час гексамери $d(A\underline{T}TAAT)_2$ і $d(T\underline{T}TAAA)_2$ з «альтернативними» нуклеотидами в положеннях -2 (*t* конформації кута γ) мають однакову форму розподілу електростатичного потенціалу і практично однакові розміри малого жолобка – 10,8Å і 10,7Å, відповідно, які мало відрізняються від розмірів малого жолобка класичної В-форми ДНК.

Очевидно, це може бути причиною малих відмінностей у формі розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка цих двох гексамерів.

АТ крок. Потенціали гексамерів d(CAATTG)₂, d(AAATTT)₂, d(GAATTC)₂, що містять в центрі найбільш жорсткий тетрамер AATT (шість структур), мають близьку за формою залежність розподілу потенціалу малого жолобка (рис. 3.8), але розрізняються по його абсолютним значенням (на ~ 2 kT/e).

Збільшення електронегативності малого жолобка в центрі таких гексамерів узгоджується зі звуженням малого жолобка, що спостерігається у А-трактів і збільшенням (по абсолютній величині) значень його потенціалу [85,149,153]. Необхідно відзначити, що тетрануклеотиди хАТх з центральним АТ кроком мають досить жорстку структуру [174]. Очевидно, низька схильність до деформації таких тетрануклеотидів визначає малу варіабельність значень електростатичного потенціалу і незначний вплив фланкуючих пар нуклеотидів на величину електростатичного потенціалу їх малого жолобка.

Гексамер d(ATATAT)₂ з центральним ТАТА тетрануклеотидом (дві структури) характеризується найменшою схожістю форми розподілу електростатичного потенціалу в порівнянні з іншими гексамерами цієї групи, має зворотну кореляцію – зменшення абсолютних значень потенціалу в центральній частині гексамерів (рис.3.8). Цей ефект може бути пояснений тенденцією ТАТА послідовностей розширювати малий жолобок [174] і таким чином зменшувати абсолютне значення електронегативного потенціалу.



Рисунок 3.8. а) Залежність електростатичного потенціалу від положення нуклеотиду для послідовностей з центральним АТ кроком положення (-1,1) показує дві центральні пари нуклеотидів; позначено положення нуклеотиду з альтернативною *gauche*- конформацією кута γ : *g*- (II) у ланцюгу II; б) матриця подібності для гексамерів з центральним АТ кроком, нуклеотид з альтернативної *g*-конформацієй кута γ підкреслений у відповідній послідовності.

Перехід кута γ в альтернативну *g*- конформацію термінального нуклеотиду гексамера d(<u>**G**</u>AATTC)₂ (рис.3.8), не призводить до помітних змін значення потенціалу в цьому положенні.

3.3.4. Сиквенс-специфічність переходів кута у.

Аналіз послідовностей коротких фрагментів ДНК, що містять нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ показав, що з 23 гексамерів ДНК переходи кута γ спостерігаються тільки у трьох послідовностей. У гексамерів з центральним GC кроком (рис. 3.6а) і з центральними ААТТ тетрамерами (рис. 3.8а) виявлена *g*-конформація. Альтернативна *t* конформація кута γ виявлена тільки для послідовностей, що містять центральний ТА крок (рис. 3.7а). Цей факт відповідає

нашим даними (підрозділ 3.1), згідно з якими t конформація кута γ у вільній В-ДНК зустрічається тільки у нуклеотидів, що містять тимін, а g- конформація — у нуклеотидів, що містять цитозин і тимін. При цьому послідовності, що містять g- конформацію кута γ , більш жорсткі і характеризуються незначним розкидом значень електростатичного потенціалу малого жолобка.

3.3.5.Комплекси екзонуклеази ЕхоХ з двома сайтами зв'язування ДНК.

Як приклад існування кореляцій між розмірами малого жолобка, конформацією кута γ і розподілом електростатичного потенціалу короткого фрагменту ДНК можна розглянути сайт зв'язування ДНК в комплексі з екзонуклеазою ЕхоХ.

Екзонуклеаза ExoX – представник сімейства DnaQ, одного з найбільших суперсімейств 3'-5 'екзонуклеаз. Екзонуклеази відіграють визначальну роль у репарації ДНК. Їх функція полягає у видаленні пошкоджених нуклеотидів з 3' кінця ДНК і неушкоджених нуклеотидів у процесі рекомбінації [175-178]. ExoX одна з декількох надлишкових (redundant) екзонуклеаз, які залучені в репараційну систему за визначенням і видаленням неправильних пар, репарації ушкоджень, викликаних УФ опроміненням, процесів рекомбінації гомологічних фрагментів і стабілізації тандемних повторів у *E. coli* [175].

У комплексах з екзонуклеазою ExoX фрагменти ДНК (сайти зв'язування ExoX) можуть мати правильне уотсон-криківське (PDB id 4FZX, conserved ДНК with 3' overhanging dsDNA) і неправильне (PDB id 4FZZ, mismatched ДНК with 3 'recessed mismatch-containing dsDNA) спарювання основ [176].

У процесі утворення комплексу ЕхоХ-ДНК спочатку відбувається «захоплення» екзонуклеазою кінця фрагменту ДНК при взаємодії поверхні білка з цукрофосфатним остовом сайту зв'язування. Формування таких контактів запобігає «зісковзуванню» білка з субстрату (сайту зв'язування) до початку реакції розщеплення фосфодіефірних зв'язків. Вони також допомагають утримувати ланцюг субстрату в потрібній позиції і орієнтації. Потім відбувається розрізання фосфодіефірних зв'язків з подальшим видаленням нуклеотидів.

За даними дослідження [176] у обох комплексів ДНК ExoX (4FZX і 4FZZ) сайт білка з цукрофосфатним остовом фрагментів зв'язування ДНК містить амінокислоти Lys111, Tyr112 і Asn114. Lys101 і Arg104, які додатково утворюють специфічний позитивно заряджений сайт зв'язування AT кроком 3 комплементарного субстрату ланцюга ДНК.

Наші розрахунки електростатичного потенціалу показали (таблиця 3.7), що ДНК з неправильним спарюванням основ (комплекс 4FZZ) має більш вузький малий жолобок у порівнянні з «правильною» ДНК (комплекс 4FZX) і більш негативний електростатичний потенціал малого жолобка в області AT динуклеотиду, що взаємодіє з Lys101 і Arg104 (рис. 3.9).

Таблиця 3.7

Структурні параметри і значення електростатичного потенціалу (kT/e) малого жолобка фрагменту d(5'-GGATCC-3')₂ у складі «неправильної» ДНК (комплекс 4FZZ) і «правильної» ДНК (комплекс 4FZX). У дужках наведені конформації кута γ.

	ланцюг I	-3G		-2G	-1	A	1T		2C		3C
	ланцюг II	-3C		-2C		Т	$1A^1$		2G		3G
				4	IFZX						
γ	ланцюг I	33,1 (<i>g</i> +)	36	36,3 (<i>g</i> +)		(g+)	11,2 (~	·g+)	31,7 (<i>g</i> +)		$15 (\sim g+)^2$
γ	ланцюг II	-11,6 (~g-)	-13	1,6 (~ <i>t</i>)	18,3 ((~g+)	125,2 ($\sim t)^2$	-172,4	$(t)^2$	42 (g+)
П	этенціал	-4,9		-5,7		,2	-5,9		-3,8		-3,5
ШИ	рина м.ж.	12,6	5	12,9)		13,0	13,4		-	3
				2	4FZZ						
γ	ланцюг I	157,5 $(t)^2$	16	$52,2(t)^2$	-132,2	2 (~ <i>t</i>)) 25,4 (~g+)		-109 (~g-)		131,1 $(\sim t)^2$
γ	ланцюг II	7,2 (~ <i>g</i> +)	-25	,6 (~g-)	-90,8	(~g-)	(~g-) -107,1 (~g		-g-) 31,4 (g		49,8 (g+)
п	этенціал	-3,4		-5,3	-7	',4	-6,	9	-4,	2	-3,5
ши		12 /		10.1	12.1		12,3		12,2		14.0

¹ аденін, який взаємодіє с Arg104.

² нуклеотид с А-подібною конформацією дезоксирибози.

³ 4FZX і 4FZZ структури мають різну кількість нуклеотидів після d(5'-GGATCC-3')₂ гексамеру, тому ширина малого жолобка для CC кроку структури 4FZX не визначалася.

Крім того, конформація фрагмента «неправильної» ДНК (комплекс 4FZZ), що взаємодіє із залишками Lys101 і Arg104, значно відрізняється від конформації «правильної» ДНК (комплекс 4FZX). У комплексі 4FZZ кут γ нуклеотиду, який містить аденін, що взаємодіє з Arg104, має значення, близьке до *g*- конформації (таблиця 3.7).



Рисунок 3.9. Комплекси екзонуклеази ExoX з двома фрагментами ДНК: (a) електростатичний потенціал послідовності $d(5'-GGATCC-3')_2$ комплексів 4FZX і 4FZZ; (б) взаємодії екзонуклеази ExoX з цукрофосфатним остовом центральних GAT кроків послідовностей ДНК. Структури фрагментів «правильної» ДНК (4FZX) і «неправильної» ДНК (4FZZ) виділені жовтим і рожевим кольорами, відповідно. Н-зв'язок між O3' атомом нуклеотиду, що містить аденін, і атомом Н аміногрупи NH₂ Arg104 (r_{O3'...HNH} = 3,1 Å) показана пунктирною лінією.

Такі структурні зміни узгоджуються з уявленнями про більш високу специфічність ExoX екзонуклеази до «неправильного» сайту ДНК, яка важлива для збільшення ефективності нереплікативного синтезу [176].

3.4. Структурні перебудови цукрофосфатного остову ДНК і механізм непрямого впізнавання

Результати статистичного і структурного аналізу кристалографічних структур дозволив нам визначити кореляцію між структурою цукрофосфатного остову (значеннями одного з кутів полінуклеотидного ланцюга і конформацією дезоксирибози), полярністю, розмірами і розподілом електростатичного потенціалу малого жолобку коротких фрагментів вільної ДНК і встановити їх сиквенсспецифічність.

Для А-ДНК максимальну схильність до конформаційних переходів кута γ (тільки в альтернативну *t* конформацію) мають нуклеотиди, що містять аденін. Для вільної В-ДНК таких переходів зафіксовано значно менше. Переходи в альтернативну *g*- конформацію кута γ спостерігаються у нуклеотидів, що містять піримідини, а в альтернативну *t* конформацію – тільки у нуклеотидів, що містять тимін. Тобто, переходи кута γ специфічні і по відношенню до форми ДНК (принаймні, на рівні упаковки дезоксирибози), і по відношенню до послідовності (типу нуклеотиду).

Переходи кута *γ* в альтернативні конформації викликають суттєву зміну полярності жолобків, змінюючи їх на протилежну. Великий жолобок у місцях локалізації нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута *γ* стає менш полярним, а малий жолобок – істотно більш полярним. Ці зміни викликані зміною площ доступних поверхонь полярних і неполярних атомів цукрофосфатного остову у нуклеотидів з некласичними конформаціями кута *γ*. Такі зміни властивостей жолобків, як і конформаційні перебудови кута *γ*, сиквенс-специфічні.

Перебудови кута у впливають на значення і форму розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка коротких фрагментів вільної ДНК, які, в свою чергу, корелюють з розмірами малого жолобка і площами доступної поверхні атомів, які формують цукрофосфатний остов. Ці параметри досліджених нами олігонуклеотидів вільної ДНК також залежать від послідовності (сиквенс-специфічні).

Перехід кута *γ* в альтернативну *t* конформацію викликає звуження малого жолобка і, як наслідок, збільшення його електронегативності. Навпаки, перехід в альтернативну *g*- конформацію призводить до збільшення ширини малого жолобка і для A/T, і для G/C пар нуклеотидів. Це пояснюється розширенням малого жолобка в місцях локалізації таких «перемкнених» нуклеотидів.

Переходи з класичної **g**+ конформації кута γ в альтернативну **t** конформацію у олігонуклеотидів з центральним ТА кроком призводить до суттєвих змін електростатичного профілю малого жолобка. Основна причина такого ефекту – звуження малого жолобка, викликане іншою геометрією «перемкнених» нуклеотидів.

Для олігонуклеотидів з центральним GC кроком спостерігаються переходи тільки в альтернативну *g*- конформацію, які також призводять до збільшення електронегативності малого жолобка в місцях локалізації «перемкнених» нуклеотидів, але причина таких змін інша: це збільшення площ доступної поверхні полярних атомів цукрофосфатного остову.

Необхідно також відзначити деяку (як пряму, так і зворотну) кореляцію між схильністю до деформації коротких фрагментів ДНК (динуклеотидів і тетрануклеотидів) і формою розподілу потенціалів малого жолобка. Гексамери з центральним гнучким ТА кроком характеризуються великим розкидом значень електростатичного потенціалу і різними формами його розподілу в малому жолобку. Навпаки, гексамери з жорстким центральним АТ кроком мають близькі значення потенціалу і практично не залежать від нуклеотидного складу фланкуючих динуклеотидних кроків. В обох випадках спостерігається пряма між схильністю деформації і кореляція до подобою форм розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка.

Для гексамерів з центральним досить гнучким СG кроком не зафіксовано конформаційних переходів кута γ, а форма розподілу електростатичного потенціалу практично не залежить від нуклеотидного складу фланкуючих динуклеотидів (зворотня кореляція).

Таким чином, представлені в розділі 3 результати доводять суттєву роль структурних перебудов цукрофосфатного остову ДНК для механізмів непрямого впізнавання, який заснований на «зчитуванні» локальних структурних перебудов подвійної спіралі ДНК, перш за все, в місцях локалізації неспецифічних ділянок ДНК – цукрофосфатного остову і малого жолобка, і використовує залежну від послідовності схильність подвійної спіралі до деформації і конформаційної варіабельності.

РОЗДІЛ 4

КОНФОРМАЦІЙНА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ КОРОТКИХ ФРАГМЕНТІВ ДНК У КОМПЛЕКСАХ З БІЛКАМИ

У розділі 4 «Конформаційна варіабельність цукрофосфатного остову коротких фрагментів ДНК у комплексах з білками» наведені результати аналізу конформаційних перебудов кута ү цукрофосфатного остову ДНК для білково-нуклеїнових кристалографічних структур комплексів. Визначено закономірності конформаційних переходів кута у в нуклеотидів з А- і В-подібною упаковкою дезоксирибози, зміни полярно/гідрофобного профілю жолобків ДНК, викликаних цими переходами, і оцінена схильність нуклеотидів з різними конформаціями кута у формувати контакти в сайтах зв'язування при утворенні комплексів з білками.

4.1. Альтернативні конформації цукрофосфатного остову ДНК в сайтах зв'язування з білками

Однією з найпоширеніших перебудов цукрофосфатного остову ДНК є перемикання торсійного кута γ (O5'-C5'-C4'-C3') з класичної gauche+ (g+) в альтернативні gauche- (g-) і trans (t) конформації, які призводять до зміни положення та орієнтаціх атомів цуккрофосфатного остову в том числі і відносно обох жолобків (рис.4.1).

Згідно з даними великої кількості робіт з кристалографії фрагментів ДНК і білково-нуклеїнових комплексів, відомих до теперішнього часу, кількість нуклеотидів з некласичними конформаціями цукрофосфатного остову в ДНК у складі комплексів з білками значно перевищує вміст таких нуклеотидів у вільній ДНК. Так, частота виникнення альтернативних конформацій торсійного кута γ в ДНК, яка взаємодіє з білками, збільшується в ~ 5 разів у порівнянні з вільною В-ДНК [179-181].



Рисунок 4.1. Зміна положення та орієнтації атомів цукрофосфатного остову у жолобках подвійної спіралі при перемиканні кута у для А- і В-подібних нуклеотидів.

Але систематичних досліджень щодо особливостей змін структури білковонуклеїнових комплексів, які можна встановити на основі аналізу доступних структурних баз даних для з'ясування ролі конформаційної мобільності подвійної спіралі ДНК в реалізації непрямого механізму білково-нуклеїнового впізнавання, до теперішнього часу не проводилися. Як правило, розглядаються і аналізуються структури комплексів ДНК або з конкретним білком, або з певними сімействами окремих білків (наприклад, з білками НОХ групи, нуклеазами, ядерними рецепторами, ТАТА-binding protein і т.д).

На першому етапі досліджень конформаційних перебудов цукрофосфатного остову подвійної спіралі ДНК в комплексах з білками ми розглянули кілька комплексів, описаних у літературі і наявних у PDB і NDB базах даних, в яких присутні нуклеотиди з некласичними конформаціями цукрофосфатного остову (значеннями кута γ і/або конформацією дезоксирибози), і де ці нуклеотиди можуть використовуватися білком у процесі непрямого впізнавання ДНК.

4.1.1. Комплекс рестриктази MspI з ДНК (PDB id 1SA3, 1YFI).

Рестриктаза MspI (з Moraxella species) відноситься до рестрикційних ендонуклеаз другого типу (Туре IIP), які впізнають паліндромні послідовності ДНК і розрізають подвійну спіраль у певній фіксованій точці всередині цих послідовностей.

Рестриктаза MspI розрізає центральний тетрамер ССGG сайту зв'язування $d(CCCCCGGGGG)_2$ (рис.4.2a) [182]. Його центральна пара нуклеотидів (C5:G16) утворює у великому жолобку прямі H-зв'язки з рестриктазой MspI (Ser251) і H-зв'язки, опосередковані молекулами води (Glu130 і Ser251). З боку малого жолобка білок також утворює опосередковані молекулами води H-зв'язки між донорно-акцепторними групами C5 і Ser27 [182]. При цьому G16 має AII конформацію цукрофосфатного остову (рис.4.26, α/γ : 130.3°/199.8°, див. таблицю 1.3), а комплементарний C5 взаємодіє з Ser 27 і має альтернативні конформації кутів α/γ : 47.9°/-80.9° цукрофосфатного остову.



Рисунок 4.2. Комплекс рестриктази Msp I з ДНК (PDB id 1SA3): (a) стереозображення комплексу; (б) центральний динуклеотидний крок C5:G16 сайту зв'язування; виділений нуклеотид, що має АІІ конформацію (GAII).

Імовірно, така структурна перебудова цукрофосфатного остову може бути використана як сигнал для впізнавання білком «свого» специфічного сайту зв'язування.

4.1.2. Комплекс BPV-1 E2 з ДНК (PDB id 2BOP).

У комплексі білка Е2 вірусу папіломи бика (bovine papillomavirus type 1, E2 BPV-1) 3 ДНК (рис. 4.3) білок зв'язується 3 додекамером d(ACCGACGTCGGT)₂, у якого центральна частина ACGT не утворює контактів з білком і може варіюватися за складом [183]. Взаємодія у великому жолобку подвійної спіралі додекамеру симетрично розташованих α-спіралей білка Е2 з двома тетрамерами ACCG і CGGT, фланкуючими центральну частину сайту впізнавання, призводить до вигину ДНК [77]. При цьому критичним для формування стабільного комплексу є саме здатність до деформації центрального тетрамера сайту зв'язування, що безпосередньо не взаємодіє з білком [184]. У залежності від його нуклеотидного складу спорідненість білка до сайту зв'язування може відрізнятися в 300 разів [185].



BPV-1 ДНК id 2BOP): Рисунок 4.3. Комплекс E2 3 (PDB (a) стереозображення комплексу; (б) центральний фрагмент сайту зв'язування; виділені OCHOB. містять нуклеотиди BII конформацією пари ЩО 3 цукрофосфатного остову ($C6_{BII}/G7:G/C_{BII}$).

Крім того, кожна з пар нуклеотидів центрального димера CG містить нуклеотиди (ріс.4.3б) в альтернативної ВІІ конформації цукрофосфатного остову ДНК (значення пари кутів є/ζ: 282°/161°, див. таблицю 1.3), що також може забезпечувати додаткову спорідненість при «зчитуванні» білком цієї послідовності за механізмом непрямого впізнавання.

4.1.3. Комплекс Heterodimeric Ecdysone Receptor 3 ДНК (PDB id 1R0O, 1R0N).

Для комплексу гетеродимерного ядерного рецептору комах (рис.4.4), в якому місцем зв'язування є паліндромний дуплекс d(AGGTCAATGACCT)₂ [186], нами виявлено, що у стартовій точці сайту зв'язування нуклеотид, який містить аденін, має А-подібну упаковку дезоксирибози і *t* конформацію кута γ (рис.4.4б).



Рисунок 4.4. Комплекс гетеродимерного рецептора з ДНК (PDB id1R0O): (a) стереозображення комплексу; (б) стартова точка сайту зв'язування: нуклеотид з А-подібною дезоксирибозою і t конформацією кута γ , що містить аденін (A); показаний амінокислотний залишок глутаміну (GLN) у зоні можливого контакту з O5' атомом аденіну (A).

Для більшості аналогічних комплексів, а за таким же принципом відбувається зв'язування з ДНК рецепторів стероїдних і нестероїдних гормонів у ссавців, нуклеотид, що містить аденін, у стартовій точці має В-подібну упаковку дезоксирибози і *g*+ конформацію кута γ, характерну для класичної В-форми ДНК [187]. Ймовірно, нуклеотид з альтернативною конформацією кута γ цукрофосфатного остову, що містить аденін, може служити сигналом при

впізнаванні свого сайту зв'язування саме для цього білка, що утворює специфічний комплекс (PDB id 1R0O, 1R0N). Для аналогічних білків, очевидно, реалізується інший механізм впізнавання, що дозволяє здійснювати дуже точний відбір місць зв'язування для кожного конкретного білка цього сімейства.

4.1.4. Комплекс ДНКази I з ДНК (PDB id 1DNK).

ДНКаза I при утворенні комплексу впізнає сиквенс-специфічні структурні зміни подвійної спіралі ДНК у ТАТА-боксі (рис. 4.5а). Білок зв'язується з ДНК в малому жолобку з центральними парами основ ТАТА-боксу, утворюючи ван-дерваальсові контакти і Н-зв'язки з основами (з них тільки один є специфічним) та цукрофосфатним остовом. При цьому відбувається розширення малого жолобка на 3 Å і вигин у напрямку до великого жолобку більш ніж на 20° [97].



Рисунок 4.5. Структури комплексів ДНК з: (a) ДНКаза I (PDB id 1DNK); (Б) білком Zif268 (PDB id 1AAY)

За допомогою програми 3DNA/CompDNA [46] ми розрахували параметри, що характеризують конформацію дезоксирибози цього фрагмента ДНК (таблиця 4.1). Результати цих обчислень свідчать про те, що частина нуклеотидів у сайті зв'язування мають А-конформацію дезоксирибози або її проміжні форми.

	лан	цюг 1	ланцюг II			
пари	δ(°)	конформація	δ(°)	конформація		
1G:C	80,1	СЗ'-ендо	116,6	О4'-ендо		
2G:C	97,6	СЗ'-ендо	85,4	СЗ'-ендо		
3T:A	94,7	СЗ'-ендо	129,8	С1'-екзо		
4A:T	76,3	СЗ'-ендо	97,0	СЗ'-ендо		
5T:A	100,5	О4'-ендо	128,7	С1'-екзо		
6A:T	127,5	С1'-екзо	136,9	С1'-екзо		
7C:G	121,8	С1'-екзо	153,9	С2'-ендо		

Параметри, що характеризують сайт зв'язування ДНКази I (PDB id 1DNK): кут δ (A-ДНК: δ=81±7°, B-ДНК: δ=125±17°) і конформація дезоксирибози

4.1.5. Комплекс Zif268 з ДНК (PDB id 1AAY).

За механізмом непрямого впізнавання утворюється комплекс білка Zif268 (транскрипційний фактор TFIIIA, сімейство «цинкові пальці») з ДНК [188]. «Цинкові пальці» – це відносно невеликі домени, які зв'язуються з ДНК і входять до складу різних білків у вигляді тандемів [97].

Згідно спектрів кругового дихроїзму [188], фрагмент ДНК в комплексі (рис.4.5б) приймає проміжну конформацію між А- і В-формою. Розраховані нами за програмою 3DNA/CompDNA [46] значення кутів Twist і Roll характерні для А-форми, а значення кута Inclination і зміщення по осі х – проміжні між А- і В-формою (таблиця 4.2).

Таблиця 4.2

кроки	Twist (°) А-ДНК: 31,1 В-ДНК: 36,0	Roll (°) А-ДНК: 8,0 В-ДНК: 0,6	Inclination (°) А-ДНК: 14,6 В-ДНК: 2,1	Slide (Å) А-ДНК: -1,53 В-ДНК: 0,23	зміщення по вісі х А-ДНК: -4,2Å В-ДНК: 0,1Å
1AC/GT	31,4	2,1	4,0	-0,5	-1,4
2CG/CG	33,7	6,0	10,3	0,3	-0,5
3GC/GC	30,8	-2,1	-4,1	-0,2	-0,1
4CC/GG	35,2	11,0	17,7	-0,3	-2,1
5CC/GG	30,6	3,3	6,2	-0,9	-2,4
6CA/TG	34,1	3,5	5,9	0,1	-0,7
7AC/GT	27,9	5,5	11,3	-0,6	-2,6
8CG/CG	36,2	7,8	12,3	-0,2	-1,4
9GC/GC	25,9	5,6	12,5	-0,1	-1,7

Структурні параметри сайту зв'язування білка Zif268 (PDB id 1AAY)

Така конформація сайту-мішені є оптимальною для утворення комплексу і служить фактором відбору при впізнаванні; зв'язування Zif268 з канонічною В-ДНК менш ефективне [188].

Таким чином, нами на підставі аналізу кристалографічних структур білковонуклеїнових комплексів зафіксована сиквенс-специфічна схильність нуклеотидів, динуклеотидних кроків, тетрамерів до конформаційних перебудов у сайтах зв'язування, яка може бути структурним «кодом» для «зчитування» білками «своєї» послідовності ДНК за механізмом непрямого впізнавання.

4.2. Сиквенс-специфічні переходи торсійного кута у цукрофосфатного остову у білково-нуклеїнових комплексах.

Для проведення аналізу кристалографічних структур білково-нуклеїнових комплексів і визначення конформаційних змін ДНК в цих комплексах, які викликані перемиканнями кута γ (з класичної g+ конформації в альтернативні t, g- конформації) і дезоксирибози (В-подібна \rightarrow А-подібна), згідно з процедурою, описаною в підрозділі 2.1, була сформована база даних білково-нуклеїнових комплексів (таблиця 4.3; додаток, таблиця 1).

Таблиця 4.3.

PDB id структур 95 білково-нуклеїнових комплексів, відібраних для аналізу

1AAY, 1AZP, 1BF4, 1CDW, 1CKQ, 1D02, 1DC1, 1DFM, 1DP7, 1DSZ, 1E3O, 1EGW, 1ESG, 1FIU, 1GU4, 1H6F, 1JX4, 1L1Z, 1L3L, 1LLM, 1LMB, 1M5R, 1MNN, 1MUS, 1NKP, 1ORN, 1QNA, 1QUM, 1RH6, 1SX5, 1TDZ, 1TRO, 1WTE, 1XYI, 1ZS4, 2A07, 2BOP, 2C7P, 2E42, 2EA0, 2FMP, 2G1P, 2HOS, 2IH2, 2NQ9, 2O4A, 2OAA, 2ODI, 2OFI, 2PFN, 2R1J, 2VBO, 2VE9, 2VLA, 2VOA, 2W42, 2W7N, 2WBS, 2WIW, 2XHI, 2XO6, 3AAF, 3BAM, 3BM3, 3BS1, 3DVO, 3E6C, 3FDE, 3FDQ, 3FSI, 3G00, 3G9M, 3GOX, 3HTS, 3I0W, 3I8D, 3IGK, 3JXY, 3KDE, 3KXT, 3L2C, 3M4A, 3MR3, 3NDH, 3O1P, 3OQG, 3OSN, 3PV8, 3PVI, 3QMD, 3RKQ, 3SAU, 3SM4, 3SQ1, 3V6T

Для комплексів з цієї бази даних ми визначили число нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ і різними упаковками дезоксирибози (таблиця 4.4). Основна кількість нуклеотидів у ДНК в комплексах з білками мають класичну конформацію g+ кута γ і А- або В-форму дезоксирибози, але кількість змінених структурних станів цукрофосфатного остову збільшується в порівнянні з вільною ДНК (таблиця 3.1), особливо для А-подібних нуклеотидів: майже третина нуклеотидів з А-подібною конформацією дезоксирибози (~ 32%) у комплексах з білками мають альтернативний стан цукрофосфатного остову.

Таблиця 4.4

конформація			
кута ү	g+	g-	t
дезоксирибози			
А-подібна	68,2	0,0	31,8
В-подібна	93,7	3,7	2,6

Число (в %) нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута у і різними упаковками дезоксирибози фрагментів ДНК в комплексах з білками

При цьому в А-подібних нуклеотидів реалізується тільки одна альтернативна конформація кута $\gamma - t$, а у В-подібних нуклеотидів – обидві, але з переважанням *g*- конформації.

Необхідно також відзначити, що А-подібні нуклеотиди з альтернативною t конформацією кута у, як і у вільній ДНК (таблиця 3.2), утворюють «кластери» (таблиця 4.5). Так, в структурах шести комплексів з даної вибірки всі нуклеотиди сайту зв'язування мають альтернативну конформацію кута у. Ще в 19 комплексах приблизно А-подібних нуклеотидів половина мають альтернативну t конформацію кута у, а в шести комплексах – по два нуклеотиди мають альтернативні конформації цукрофосфатного остову. У ДНК з В-подібною упаковкою дезоксирибози (і у вільному, і у зв'язаному з білками станах) знайдено лише кілька структур, в яких окремі нуклеотиди з альтернативної gконформацією кута у «згруповані» в межах одного сайту зв'язування ДНК.

Число А- і В-подібних фрагментів ДНК*, які мають певну кількість (у%) нуклеотидів з альтернативною конформацією кута ү (позначення відповідають позначенням таблиці 3.2).

Ν	128							
	А-подібні	В-подібі						
N1	59		128					
кут ү N2	t	t	g-	t & g-				
0 %	26	102	109	92				
1 – 10 %	-	9	10	10				
11 - 20 %	4	12	4	13				
21 - 30 %	4	2	1	6				
31 - 40 %	4	2	3	4				
41 – 50 %	8	1	1	2				
51-60 %	2	-	-	-				
61 – 70 %	4	-	-	1				
71 - 80 %	1	-	-	-				
81 - 90 %		-	-	-				
91 - 100 %	6	-	-	-				

^{*}Деякі структури ДНК містять нуклеотиди з двома конформаціями дезоксирибози; вони враховуються і з А-, і з В-подібними нуклеотидами.

В-подібні нуклеотиди з альтернативної t конформацією кута γ зустрічаються тільки ізольовано. Ці результати дозволяють припустити, що одночасний перехід дезоксирибози в А-подібну конформацію і кута γ в t конформацію може полегшувати утворення комплексів з певними класами білків.

Особливо цікавим є результат, який підтверджує сиквенс-специфічність виявлених змін цукрофосфатного остову, оскільки існування залежності таких конформаційних перебудов від послідовності нуклеотидів може бути одним із способів, що дозволяють білкам відбирати «свій» сайт зв'язування, використовуючи і структурний, і хімічний сигнали «впізнавання» конкретної послідовності ДНК.

Кількість різних конформацій кута у для кожного з чотирьох типів нуклеотидів і упаковка дезоксирибози фрагментів ДНК в комплексах з білками наведені в таблиці 4.6.

конформація дезоксирибози	А-подібна			В-подібна			
кут ү	g+	g-	t	<i>g</i> +	g-	t	
нуклеотид							
середнє	67,2	-	32,8	93,4	3,9	2,7	
Α	66,7	-	33,3	95,6	2,2	2,2	
С	75,6	-	24,4	90,1	6,0	3,9	
G	47,1	-	52,9	96,0	1,9	2,1	
Т	79,6	-	20,4	92,0	5,4	2,7	

Кількість нуклеотидів (в %) з альтернативними конформаціями кута γ і А- або Вподібною упаковкою дезоксирибози

Ці результати і порівняння їх з даними для аналогічних перебудов у вільній ДНК (див. таблицю 3.1) показують, що переходи кута γ з класичної g+ конформації кута γ в альтернативну t конформацію переважають у А-подібних нуклеотидів, що містять пурини, аденін і гуанін (33% і 53%, відповідно).

У В-подібної ДНК альтернативні g- і t конформації кута γ більш поширені у нуклеотидів, що містять піримідини — цитозин і тимін, але загальний відсоток альтернативних конформацій у В-подібних нуклеотидів нижчий. Також зафіксовано перевагу g- конформації над t конформацією кута γ для нуклеотидів, що містять піримідини, і відсутність такої переваги для нуклеотидів, що містять пурини.

4.3. Площа доступної поверхні атомів у білково-нуклеїнових комплексах. Полярність жолобків зв'язаної ДНК.

За допомогою алгоритму, наведеного в підрозділі 2.4, розраховані абсолютні значення площі доступної поверхні (ПДП) кожного атома ДНК, експонованих в малий або великий жолобки. За цими даними була проведена оцінка загальної полярної і гідрофобної ПДП основ і цукрофосфатного остову в малому і великому жолобках. Середні значення ПДП для всіх розглянутих нуклеотидів наведені в таблиці 4.7 і на рис.4.6, стандартні відхилення дані в додатку (таблиця 7).

99

Абсолютні значення полярної і гідрофобної ПДП (Å²) в малому і великому жолобках для А- і В-подібних нуклеотидів з різними конформаціями кута у для б В.

цукрофосфатний остов										
дезоксирибоза		А-подібна В-подібна								
жолобок	вел	икий	мал	пий	I	великий			малий	1
кут ү нуклеотид	g+	t	g+	t	<i>g</i> +	g-	t	g+	g-	t
Полярна ПДП, Å ²										T
середнє	45,2	37,	9 36,1	51,5	48,7	48,2	44,4	33,8	50,6	36,7
А	46,3	39,	36,4	51,7	49,6	47,8	40,7	33,4	52,0	27,1
С	46,0	37,	3 36,6	53,7	48,8	48,1	41,2	33,8	51,2	43,6
G	48,0	37,3	3 34,7	50,8	48,1	46,9	48,1	34,6	47,0	39,1
Т	41,5	38,	7 35,8	49,2	48,3	48,8	48,2	33,2	50,7	35,7
			Гідроф	обна ПД	П, Å ²					
середнє	1,1	14,	1 55,5	36,0	11,4	11,2	27,8	45,2	25,7	22,7
А	1,5	12,	8 57,7	38,9	11,3	11,2	33,5	46,5	26,7	22,5
С	1,1	12,	7 54,8	37,9	10,9	10,6	28,2	43,9	24,7	22,7
G	1,0	16,	57,2	34,5	12,3	15,0	22,3	47,0	27,0	25,0
Т	0,8	13,	3 53,8	32,3	10,9	10,4	26,9	43,0	25,5	20,9
				Основи						
дезоксирибоза		А-п	юдібна				В-поді	бна		
жолобок	Вели	кий	мали	ій	I	великий			малий	
кут ү нуклеотид	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	g-	t	<i>g</i> +	g-	t
			Поля	рна ПДП	l, Å ²					
середнє	12,2	18,1	8,1	5,7	11,6	11,9	11,8	7,0	5,6	6,8
А	15,5	19,1	6,4	3,3	15,1	17,3	15,5	3,6	2,7	4,0
С	10,6	147	61	27	10.2	12.2	88	4,3	3,5	4,1
G		14,7	0,1	5,7	10,5	12,2	0,0	,		
0	20,2	23,5	12,5	8,5	10,5	12,2	17,9	14,1	16,7	15,5
T	20,2 7,0	23,5 8,8	12,5 9,8	8,5 5,5	10,3 14,1 5,9	12,2 18,6 7,0	17,9 6,7	14,1 5,5	16,7 4,7	15,5 5,4
T	20,2 7,0	23,5 8,8	0,1 12,5 9,8 Гідроф	3,7 8,5 5,5 юбна ПД	10,3 14,1 5,9 П, Å ²	12,2 18,6 7,0	17,9 6,7	14,1 5,5	16,7 4,7	15,5 5,4
С С С С С С С С С С С С С С С С С С С	20,2 7,0 15,2	14,7 23,5 8,8 18,1	0,1 12,5 9,8 Гідроф 2,2	3,7 8,5 5,5 обна ПД 1,2	10,3 14,1 5,9 П, Å ² 18,4	12,2 18,6 7,0 26,1	17,9 6,7 21,2	14,1 5,5 1,6	16,7 4,7 1,0	15,5 5,4 2,3
Т середнє А	20,2 7,0 15,2 5,5	14,7 23,5 8,8 18,1 8,1	0,1 12,5 9,8 Гідроф 2,2 8,4	3,7 8,5 5,5 обна ПД 1,2 4,6	10,3 14,1 5,9 П, Å ² 18,4 7,9	12,2 18,6 7,0 26,1 8,7	17,9 6,7 21,2 11,8	14,1 5,5 1,6 4,9	16,7 4,7 1,0 2,7	15,5 5,4 2,3 6,6
С Т середнє А С	20,2 7,0 15,2 5,5 14,5	14,7 23,5 8,8 18,1 8,1 19,4	0,1 12,5 9,8 Гідроф 2,2 8,4 0,5	3,7 8,5 5,5 юбна ПД 1,2 4,6 0,2	10,3 14,1 5,9 П, Å ² 18,4 7,9 19,0	12,2 18,6 7,0 26,1 8,7 21,0	3,3 17,9 6,7 21,2 11,8 18,6	14,1 5,5 1,6 4,9 0,0	16,7 4,7 1,0 2,7 0,0	15,5 5,4 2,3 6,6 1,2
С Т середнє А С С С	20,2 7,0 15,2 5,5 14,5 4,4	14,7 23,5 8,8 18,1 19,4 11,2	0,1 12,5 9,8 Гідроф 2,2 8,4 0,5 1,2	3,7 8,5 5,5 юбна ПД 1,2 4,6 0,2 0,5	$ \begin{array}{r} 10,3 \\ 14,1 \\ 5,9 \\ \Pi, Å^2 \\ 18,4 \\ 7,9 \\ 19,0 \\ 8,9 \\ \end{array} $	12,2 18,6 7,0 26,1 8,7 21,0 17,5	3,3 17,9 6,7 21,2 11,8 18,6 10,7	14,1 5,5 1,6 4,9 0,0 0,6	16,7 4,7 1,0 2,7 0,0 3,9	15,5 5,4 2,3 6,6 1,2 1,6

білково-нуклеїнових і	комплексі
-----------------------	-----------



Рисунок 4.6. ПДП атомів цукрофосфатного остову і основ у великому і малому жолобках для нуклеотидів з різними конформаціями кута γ і упаковкою дезоксирибози. Темно-синій колір відповідає значення ПДП полярних атомів цукрофосфатного остову ДНК; блакитний – ПДП неполярних атомів цукрофосфатного остову ДНК; темно-сірий – ПДП полярних атомів основ ДНК; світло-сірий – ПДП неполярних атомів основ ДНК.

На рис.4.7 представлені значення співвіднощення полярної/гідрофобної ПДП.

Нуклеотиди з класичною g+ конформацією кута γ і двома різними упаковками дезоксирибози (В- або А-подібні конформації) мають співвідношення полярної до гідрофобної ПДП більше 1 у великому жолобку і менше 1 у малому. У великому жолобку нуклеотиди, що містять пурини, особливо з А-подібною конформацією дезоксирибози, мають більш високі значення співвідношення полярної і гідрофобної ПДП, ніж нуклеотиди, що містять піримідини, завдяки більш високій експозиції полярних атомів аденіну і гуаніну і гідрофобних атомів цитозину і тиміну (таблиця 4.7, рис. 4.6.).



Рисунок 4.7. Співвідношення середньої полярної/гідрофобної ПДП атомів, експонованих у великий (верхні стовпчики) і малий (нижні стовпчики) жолобки для нуклеотидів з А- або В-подібною упаковкою дезоксирибози і різними (g+, g-, t) конформаціями кута γ зв'язаної ДНК. Планки похибок відображають стандартне відхилення.

Переходи в альтернативні конформації кутів у викликають значні зміни полярно-гідрофобного профілю обох жолобків.

У малому жолобку переходи кута γ в t і g- альтернативні конформації збільшують співвідношення полярної і гідрофобної ПДП, воно стає більшим 1 завдяки одночасному збільшенню абсолютних значень полярної і зменшення абсолютних значень гідрофобної ПДП атомів цукрофосфатного остову ДНК. У середньому співвідношення полярної і гідрофобної поверхонь збільшується в 2,4 рази у нуклеотидів з g- конформацією кута γ і В-подібною упаковкою дезоксирибози і в 2 рази у нуклеотидів з t конформацією кута γ незалежно від упаковки дезоксирибози.

У великому жолобку перемикання кута γ з g+ в t конформацію кута γ викликає інший ефект: спостерігаються одночасні протилежні зміни абсолютних значень полярної і гідрофобної поверхонь атомів цукрофосфатного остову, які призводять до зменшення полярно/гідрофобного співвідношення в 1,8 і 2 рази у В- і А-

подібних нуклеотидів, відповідно. Найбільш значні зміни спостерігаються у випадку А-подібних нуклеотидів, що містять гуанін, у яких ПДП зменшується в 5,7 разів. $g + \rightarrow g$ - перехід кута γ у В-подібних нуклеотидів не призводить до значних змін будь-якої ПДП або полярно/гідрофобного співвідношення у великому жолобку.

Також як у нуклеотидів з класичною g+ конформацією кута γ , нуклеотиди, що містять пурини, мають більш високі значення співвідношення полярної до гідрофобної поверхонь у великому жолобку, ніж нуклеотиди, що містять піримідини з альтернативними конформаціями кута γ , завдяки відмінностям полярних і гідрофобних ПДП атомів основ. GC пари у всіх конформаціях кута γ більш полярні, ніж AT пари, крім нуклеотидів з В-подібною конформацією дезоксирибози і g- конформацією кута γ .

Полярно-гідрофобний профіль нуклеотидів і з класичною, і з альтернативними конформаціями кута γ залежать від послідовності. Сиквенсспецифічність значень ПДП обох жолобків проявляється в більшій полярності комплементарних GC пар нуклеотидів у порівнянні з полярністю комплементарних АТ пар нуклеотидів незалежно від упаковки дезоксирибози.

Цей висновок узгоджується з даними більш раннього дослідження, які грунтувалися на аналізі бази даних білково-нуклеїнових комплексів, отриманих з більш низькою роздільною здатністю [189]. Згідно з результатами, представленими в роботі [189], GC пари нуклеотидів більш полярні, ніж АТ пари нуклеотидів у обох жолобках. Ми показали, що цей висновок вірний для всіх розглянутих нами конформацій нуклеотидів за винятком нуклеотидів з В-подібною упаковкою дезоксирибозою і *g*- конформацією кута γ , у яких ПДП атомів у великому жолобку більш полярна в АТ пар.

Наші результати показують, що зміна конформації кута у цукрофосфатного остову ДНК приводить до іншого полярно/гідрофобного профілю поверхні ДНК, доступної у великому і малому жолобках. Нуклеотиди з *g*+ конформацією кута у і обома упаковками дезоксирибози мають полярний профіль великого жолобка і гідрофобний – малого. При конформаційних переходах в альтернативні

конформації кута у малий жолобок стає більш полярним, а великий жолобок – більш гідрофобним у результаті одночасних протилежних змін ПДП полярних і гідрофобних атомів цукрофосфатного остову.

4.4 ПДП атомів ОЗ', О5' і С5' у малому і великому жолобках.

Нами також була розглянута можливість кореляції між конформацією нуклеотидів і ПДП двох полярних ОЗ', О5' і одного гідрофобного С5' атомів цукрофосфатного остову (таблиця 4.8, рис. 4.8; стандартні відхилення наведені в додатку, таблиця 8), які найбільш часто утворюють білково-нуклеїнові контакти в комплексах.

У нуклеотидів з усіма досліджуваними конформаціями кута γ атом O3' експонований тільки в малий жолобок. У нуклеотидів з класичною g+ конформацією кута γ і А-подібною упаковкою дезоксирибози ПДП O3' атома в малому жолобку вище, ніж у В-подібних нуклеотидів. Переходи в t і gконформації кута γ збільшують ПДП O3' атомів. ПДП O3' атому в малому жолобку вище у нуклеотидів з t конформацією кута γ і з будь-якою упаковкою дезоксирибози, які містять гуанін.

У нуклеотидів з класичною g+ конформацією кута γ атом O5' практично не експонований у жолобки. Для нуклеотидів з альтернативними t і g- конформаціями кута γ отримано збільшення ПДП O5' атому в малому жолобку. У великому жолобку цей ефект менш виражений і зафіксований тільки для нуклеотидів з В-подібною упаковкою дезоксирибози.

Нуклеотиди з А-подібною упаковкою дезоксирибози і t конформацією кута γ мають більш високі значення ПДП атому О5', ніж нуклеотиди з t конформацією кута γ і В-подібною упаковкою дезоксирибози. З усіх основ виділяються нуклеотиди, що містять гуанін, які мають найбільш низькі значення ПДП О5' у малому жолобку в нуклеотидів з t конформацією кута γ і А- і В-подібною упаковкою дезоксирибози. Найбільші значення ПДП

O5' атома спостерігаються у нуклеотидів з А-подібною упаковкою дезоксирибози і *t* конформацією кута γ, які містять цитозин.

Таблиця 4.8

Значення ПДП (Å²) атомів O3', O5' і C5' у нуклеотидів з А- і В-подібними конформаціями дезоксирибози і різними конформаціями кута у у великому і малому жолобках

конформація		А-по	дібна		В- подібна					
жолобок	вел	икий	мал	ий	великий			Малий		
кут ү нуклеотид	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	g-	t	<i>g</i> +	g-	t
			03'	ПДП	, Å ²					
середнє	0.2	0.2	5.0	5.3	0.0	0.0	0.0	3.3	5.5	4.8
Α	0.1	0.4	5.2	5.4	0.0	0.0	0.0	3.6	5.9	3.6
С	0.2	0.3	5.0	5.2	0.0	0.0	0.1	3.1	5.3	4.8
G	0.3	0.0	5.3	5.6	0.0	0.0	0.0	3.2	4.6	5.6
Т	0.2	0.0	4.8	4.9	0.0	0.0	0.0	3.2	5.7	5.4
			O5'	ПДП	, Å ²					
середнє	0.5	0.5	0.0	5.6	0.4	1.7	1.0	0.0	3.1	2.8
Α	0.4	0.3	0.1	6.4	0.5	1.4	1.5	0.0	3.8	3.4
С	0.7	0.0	0.0	8.0	0.4	2.3	0.7	0.0	2.6	3.1
G	0.6	1.1	0.1	3.5	0.6	0.4	0.5	0.1	4.9	2.2
Т	0.3	0.0	0.0	5.8	0.2	1.8	1.4	0.0	2.6	2.4
			C5'	ПДП	, Å ²					
середнє	0.1	13.0	23.7	6.9	0.1	1.7	19.0	23.8	2.9	3.9
Α	0.1	11.8	24.3	7.8	0.1	1.3	21.5	24.1	3.2	7.3
С	0.1	11.7	23.9	7.7	0.1	1.5	17.9	23.5	1.9	3.4
G	0.1	15.0	24.0	6.2	0.1	3.5	15.7	24.7	6.3	3.0
Т	0.0	11.9	23.0	55	0.1	14	20.8	22.8	2.4	2.0

У нуклеотидів з класичною конформацією кута γ і будь-якою упаковкою дезоксирибози атом C5' переважно експонований у малий жолобок. У нуклеотидів з переключеним *t* станом кута γ , атом C5' «повертається» у великий жолобок, і значення ПДП атома C5' у В-подібних нуклеотидів збільшується приблизно в два рази, ніж у А-подібних нуклеотидів. При цьому ПДП C5' атому в малому жолобку вища в А-подібних нуклеотидів з *t* конформацією кута γ . У В-подібних нуклеотидів з *g*- конформацією кута γ атом C5' «захований» всередині ДНК з

мінімальною експозицією в будь-який жолобок (крім нуклеотидів, що містять гуанін, які мають найбільші значення ПДП С5' атома в обох жолобках).



Рисунок 4.8. Розподіл ПДП атомів ОЗ', О5' и С5' (Å²) для А-подібних (ліворуч) і В-подібних (праворуч) нуклеотидів з різними конформаціями кута у у великому і малому жолобках.

Таким чином, нами виявлено зміни ПДП полярних ОЗ', О5' і неполярного С5' атомів у результаті перебудов цукрофосфатного остову ДНК у комплексах з білками: у нуклеотидів з обома альтернативними конформаціями кута γ доступність ОЗ' і О5' атомів у малому жолобку збільшується, а ПДП С5' атома зменшується, але атом С5' стає більш доступним у великому жолобку. Зафіксовані зміни ПДП полярних ОЗ', О5' і неполярного С5' атомів є сиквенс-специфічними.

4.5. Аналіз білково-нуклеїнових контактів.

Для дослідження залученості нуклеотидів у білково-нуклеїнові контакти розраховані і проаналізовані два параметри: відсоток нуклеотидів, які взаємодіють з білками у великому і малому жолобках, і середнє число контактів на нуклеотид, який бере участь у взаємодіях з білками. Обидва параметри обчислювалися з припущення, що пара атомів взаємодіє, якщо відстань між атомами не перевищує 4.5Å (див. розділ 2.4). Результати аналізу білково-нуклеїнових контактів для нуклеотидів з різними конформаціями кута γ показані на рисунку 4.9. Також був проаналізован розподіл контактів нуклеотидів з усіма типами амінокислот (контактні профілі) для обох жолобків (рис. 4.10, таблиця 4.9).

В обох жолобках А-подібні нуклеотиди з класичною g+ конформацією кута γ (їх загальна кількість 152) утворюють 1554 контакти з білками, або в середньому 10,2 контакти на 1 нуклеотид, тоді як 1352 В-подібних нуклеотиди з g+ конформацією кута γ утворюють 10234 контакти, або в середньому 7,6 контакти на 1 нуклеотид. При цьому А-подібні нуклеотиди з класичною g+ конформацією кута γ частіше взаємодіють з білками в малому жолобку, в той час як В-подібні нуклеотиди частіше утворюють білково-нуклеїнові контакти у великому жолобку (рис.4.9,4.10).

Перехід А-подібних нуклеотидів, що містять аденін і гуанін, у t конформацію кута γ збільшує кількість їх контактів з білками в обох жолобках. Необхідно відзначити, що всі А-подібні нуклеотиди, які містять тимін, утворюють білковонуклеїнові контакти в обох жолобках. А-подібні нуклеотиди, що містять цитозин, навпаки видрізняються від нуклеотидів з альтернативною t конформацією кута γ тим, що вони рідше залучаються до білково-нуклеїнових контактів у обох жолобках, ніж А-подібні нуклеотиди з класичною g+ конформацією кута γ .

У В-подібних нуклеотидів перехід в альтернативну t конформацію кута γ у малому жолобку збільшує число контактів і відсоток взаємодіючих нуклеотидів, які містять цитозин і гуанін, та не змінює ці параметри у нуклеотидів, що містять тимін, і зменшує у нуклеотидів, що містять аденін. У великому жолобку відсоток

взаємодій у всіх В-подібних нуклеотидів з альтернативною *t* конформацією кута ү нижчий, ніж у нуклеотидів з класичною *g*+ конформацією.



Рисунок 4.9. Відсоток А- та В-подібних нуклеотидів, які взаємодіють з білками в різних жолобках ДНК.

Переход кута ү в *g*- конформацію у В-подібних нуклеотидів в обох жолобках збільшує відсоток взаємодіючих нуклеотидів, що містять гуанін. У той же час у нуклеотидів, що містять цитозин або тимін, ці параметри значно зменшуються в обох жолобках.

Таким чином, А-подібні нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута ү мають більший відсоток взаємодіючих нуклеотидів і більше число білковонуклеїнових контактів в обох жолобках, ніж В-подібні нуклеотиди з тією ж конформацією кута γ. Єдиним винятком є нуклеотиди з *t* конформацією кута γ, що містять цитозин, у яких ці параметри у малому жолобку вищі у нуклеотидів з Вподібною конформацією дезоксирибози. Аналіз білково-нуклеїнових контактів показує, що здатність нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ взаємодіяти з білками сиквенс-спеціфічна. Для А-подібних нуклеотидів виявлено збільшення числа таких контактів у обох жолобках для всіх нуклеотидів з альтернативною t конформацією кута γ крім нуклеотидів, що містять цитозин. Важливо, що 100% А-подібних нуклеотидів, які містять тимін з альтернативною t конформацією кута γ з досліджуваної вибірки структур, взаємодіють з білками в обох жолобках. В-подібні нуклеотиди, які містять гуанін і цитозин з t конформацією кута γ , мають більш високу схильність до утворення білково-нуклеїнових контактів у малому жолобку, а В-подібна g-конформація кута γ вигідна для утворення контактів у обох жолобках для нуклеотидів, що містять гуанін. Також виявлена більша схильність А-подібних нуклеотидів, що мають ту ж конформацію, крім нуклеотидів, що містять цитозин з t конформацію, крім нуклеотидів, що містять цитозин з t конформацію контактів у малому жолобку, а В-подібна g-конформаців взаємодіяти з білками в малому жолобку, ніж В-подібних нуклеотидів, що містять гуанін. Також виявлена більша схильність А-подібних нуклеотидів, що мають ту ж конформацію, крім нуклеотидів, що містять цитозин з t конформацію, крім нуклеотидів, що містять цитозин з t конформацію контактів у малому жолобку, ніж В-подібних нуклеотидів, що мають ту ж конформацію, крім нуклеотидів, що містять цитозин з t конформацію контактів у в в лостять цитозин з t конформацію в за контакти нуклеотидів, що містять цитози н з t конформацію кута γ .

Аналіз контактів між різними за типом амінокислотними залишками (полярними та гідрофобними) і нуклеотидами з різними конформаціями цукрофосфатного остову (рис. 4.10, таблиця 4.9), показав, що незалежно від конформації нуклеотиди створюють більше контактів з полярними амінокислотами, ніж с гідрофобними в обох жолобках. Але профіль таких контактів відрізняється у жолобках і суттєво залежить як від конформації дезоксирибози, так і кута γ.

Для нуклеотидів з класичною g+ конформацією кута γ профіль контактів в обох жолобках схожий незалежно від конформації дезоксирибози. Співвідношення кількості контактів нуклеотидів з полярно/гідрофобними амінокислотами в обох жолобках приблизно однакові: для А-подібних 4 і 2,3 та для В-подібних 4,6 і 2,8 у великому та малому жолобках, відповідно. При перемиканні з g+ конформації кута γ на t конформацію для А-подібних нуклеотидів в обох жолобках кількість контактів з полярними амінокислотами збільшується, тоді як з гідрофобними амінокислотами зменшується: співвідношення контактів з полярно/гідрофобними амінокислотами дорівнює 5,7 і 2,7 у великому та малому жолобках, відповідно. Для В-подібних нуклеотидів з t конформацію кута γ спостерігається схожа тенденція у малому
жолобку, й інша – у великому: співвідношення контактів з полярно/гідрофобними амінокислотами складає 3,1 і 4,1 у малому та великому жолобках, відповідно.

Перехід В-подібних нуклеотидів у g- конформацію кута γ зменшує утворення контактів з полярними амінокислотами і збільшує — з гідрофобними в обох жолобках. Співвідношення контактів з полярно/гідрофобними амінокислотами складає 2,5 і 1,8 у великому та малому жолобках, відповідно. Треба відзначити, що взагалі (але з деякими розбіжностями) зміна профілів білково-нуклеїнових контактів у жолобках при зміні конформації цукрофосфатного остову узгоджується зі зміною полярно/гідрофобного профілю поверхні ДНК, доступної у великому і малому жолобках (підрозділ 4.3). Наприклад, зменшення полярного профілю великого жолобка при перемиканні кута γ в альтернативні конформації викликає зменшення контактів з гідрофобними амінокислотами. Для А-подібних нуклеотидів, у великому жолобку спостерігається протилежний ефект, тоді як збільшення полярності малого жолобку співпадає зі збільшенням контактів між А-подібними нуклеотидами з альтернативною t конформацією та полярними амінокислотами і зменшенням кількості контактів з гідрофобними.

Профілі контактів згідно з нашими результатами характеризуються певною сиквенс-специфічністю, тобто різною схильністю певних нуклеотидів до утворення контактів з полярними і гідрофобними амінокислотами в обох жолобках (рис.4.10). Наприклад, А-подібні нуклеотиди з класичною конформацією кута γ , які містять аденін і цитозин, утворюють більше контактів з полярними амінокислотами у великому жолобку, а при перемиканні у кута γt конформацію більше таких контактів утворюють нуклеотиди, які містять гуанін (рис.4.10). У В-подібних нуклеотидів, які містять аденін, можна вказати на зміну кількості контактів з полярними амінокислотами у великому жолобку.



Рисунок 4.10. Загальна кількість контактів (контактні профілі) у жолобках між нуклеотидами з визначеними конформаціями дезоксирибози і кута у та амінокислотами; гідрофобні амінокислоти: IFVLWMAGCP, полярні амінокислоти: YTSHENQDKR.

Таблиця 4.9.

Процент контактів від загальної кількості контактів нуклеотидів з даною конформацією дезоксирибози і кута у для гідрофобних і полярних амінокислот

		велик	ий жолс	бок	малий жолобок						
дезоксирибоза	А-под	ібна	B	8-подібн	ia	А-по	дібна	В-подібна			
контакти кут ү	g+	t	<i>g</i> +	t	g-	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	t	g-	
Гідрофобні ак	19,5	14,9	17,6	19,6	28,9	30,2	26,9	25,8	24,3	35,8	
Полярні ак	80,5	85,1	82,3	80,4	71,0	69,8	73,1	74,2	75,7	64,2	

(ак).

Таким чином, можна узагальнити отримані результати та зробити відповідні висновки щодо впливу конформації цукрофосфатного остову на утворення контактів у білково-нуклеїнових комплексах.

Кількість і тип білково-нуклеїнових контактів та їх розподіл по жолобках має певну залежність від конформації цукрофосфатного остову та типу амінокислот у сайтах зв'язування. Перехід до t конформації А-подібних нуклеотидів збільшує схильність до формування контактів з полярними амінокислотами в обох жолобках (кількість контактів збільшується на 3,3% у малому і 4.6% у великому). Для В-подібних нуклеотидів перебудова кута γ у g- конформацію вигідніша для утворення контактів з гідрофобними амінокислотами в обох жолобках (кількість контактів з полярними в обох жолобках (кількість контактів з перебудова кута γ у g- конформацію вигідніша для утворення контактів з гідрофобними амінокислотами в обох жолобках (кількість контактів збільшується на $\approx 10\%$). Слід відзначити також, що нуклеотиди з t конформацією кута γ мають мінімальний процент контактів з гідрофобними амінокислотами в обох жолобках, за винятком взаємодій В-подібних нуклеотидів у великому жолобку. Зафіксовані особливості формування білково-нуклеїнових контактів у жолобках є сиквенс-специфічними.

4.6. Роль альтернативних конформацій цукрофосфатного остову в білково-нуклеїновому впізнаванні.

Як описані вище зміни в структурі подвійної спіралі ДНК можуть бути використані при реалізації і поясненні механізмів білково-нуклеїнового впізнавання?

Відомо, що білково-нуклеїнове впізнавання при зв'язуванні білків у малому жолобку визначається формуванням гідрофобних контактів неполярних амінокислотних залишків через збільшення доступності гідрофобної поверхні ДНК в разі сиквенс-специфічних В → А перебудов дезоксирибоз [39]. У той же час збільшення електронегативності при звуженні малого жолобка, що спостерігається в А-трактах, які мають В'-конформацію подвійної спіралі, використовується для утворення контактів з позитивно зарядженими залишками аргініну бічних ланцюгів білків [87, 105, 153]. Тому можна припустити, що зміна полярно-гідрофобного профілю нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута у безпосередньо використовується білками при непрямому впізнавання сайтів зв'язування на ДНК.

Виявлені конформаційні переходи кута γ з класичного в альтернативні стани викликають суттєві зміни полярно-гідрофобного профілю малого і великого жолобків через різну доступність полярних і неполярних атомів остову, зокрема, O3', O5' і C5' атомів. У порівнянні з нуклеотидами, що мають класичну *g*+ конформацію, у нуклеотидів з альтернативними конформаціями полярнонеполярне відношення збільшується в малому жолобку і зменшується у великому через різний характер зміни доступної поверхні полярних і неполярних атомів. Так, у нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ площа доступної поверхні полярних атомів O3' і O5' збільшується в малому жолобку, тоді як у атомів C5' зменшується. У великому жолобку доступність атомів C5', навпаки, збільшується. Важливість цих фактів пов'язана з тим, що такі зміни ПДП можуть впливати на участь атомів O3', O5' і C5' у неспецифічних білково-нуклеїнових контактах.

Встановлена і яскраво виражена сиквенс-специфічність полярного-неполярного профілю жолобків. Наприклад, полярно-неполярне співвідношення у великому жолобку вище у нуклеотидів, що містять пурини, через більшу доступність їх полярних атомів. При цьому зберігається більша полярність комплементарних GC пар нуклеотидів для чотирьох з п'яти розглянутих конформацій цукрофосфатного остову. Тобто, зафіксована сиквенс-специфічність змін ПДП полярних і неполярних атомів у нуклеотидів з будь-якими конформаціями кута у узгоджується з уявленнями про більшу полярність GC пар у порівнянні з АТ парами [189].

Аналізуючи білково-нуклеїнові взаємодії, ми отримали підтвердження того, що крім високої здатності до утворення контактів у малому жолобку в нуклеотидів з Аподібною упаковкою дезоксирибози, А-подібні нуклеотиди з *t* конформацією кута ү частіше взаємодіють з білками в обох жолобках, ніж А- подібні нуклеотиди з класичною конформацією кута ү. Ця тенденція найбільш виражена у нуклеотидів, що містять тимін. Нуклеотиди з В-подібною упаковкою дезоксирибози і *t* конформацією кута (у малому жолобку перевагу мають нуклеотиди, що містять цитозин і гуанін), тоді як нуклеотиди з *g*- конформацією кута γ утворюють менше контактів, і ця тенденція більш виражена в малому жолобку.

Тому можна припустити, що зміни полярно-неполярного профілю жолобків, які спостерігаються при перемиканні кута γ і/або переході дезоксирибози з C2'-ендо- в C3'-ендо форму можна розглядати як один з можливих способів реалізації механізму непрямого білково-нуклеїнового впізнавання.

Схожий механізм використовується білками при впізнаванні розмірів і розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка, в результаті якого виникають контакти між більш електронегативним вузьким малим жолобком, характерним для А-трактів, що мають В'-конформацію подвійної спіралі, і позитивно зарядженими залишками аргініну [97, 190]. Цей механізм важливий для специфічного зв'язування різних класів білків з ДНК [191-193] і для формування нуклеосом [153, 194, 195], у яких спостерігається значна кількість нуклеотидів, що мають альтернативні конформації кута γ [181].

Виявлено і дещо інший механізм непрямого впізнавання білками полярного профілю малого жолобка, точніше, неполярного, оскільки, при одночасному сиквенс-специфічному перемиканні дезоксирибози з С2'-ендо- в С3'-ендо-конформацію у кількох сусідніх по ланцюгу нуклеотидів, значно збільшується гідрофобність малого жолобка, що сприяє впізнаванню цих ділянок малого жолобка гідрофобними амінокислотними залишками білків [39].

Роль нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута у в процесах білково-нуклеїнового впізнавання при утоворенні комплексів може відрізнятися.

По-перше, незважаючи на відносно високий енергетичний бар'єр переходів кута γ в альтернативні конформації (більше 4 ккал/моль для GC пар [49]), такі нуклеотиди виявлені і у вільній ДНК. Тобто, у вільній ДНК існують структурні «сигнали», які необхідні в процесі пошуку білками «свого» сайту зв'язування, що передує власне утворення комплексу. Так відбувається, наприклад, при «впізнаванні» білками згрупованих А-подібних GC-кластерів, які у вільній ДНК мають тенденцію до спонтанних переходів у А-форму [60, 129-131]. Аналіз

розподілу нуклеотидів з різними упаковками дезоксирибози за їхньою здатністю до переходу в альтернативні конформації кута γ у вільній ДНК показує, що в В-ДНК реалізуються обидві конформації: *g*- і *t*. У А-ДНК виявлено більше число нуклеотидів з альтернативними конформаціями, але тільки одного типу – *t* конформацією кута γ , а *g*- конформація «заборонена». Також доведено, що здатність нуклеотидів зазнавати конформаційні переходи у вільній ДНК сиквенсспецифічна. Наприклад, А-подібні нуклеотиди, що містять пурини, більш схильні до конформаційних переходів кута γ (у вільній А-ДНК близько 20% нуклеотидів, що містять аденін і гуанін, мають *t* конформацію кута γ), і менш властиві такі перебудови для піримідинових нуклеотидів. А нуклеотиди, що містять тимін, у вільній ДНК мають тільки класичну *g*+ конформацію кута γ незалежно від упаковки дезоксирибози (див. розділ 3 і [58, 60]). Тобто, нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ можуть бути структурним сигналом для певних класів білків у процесі «зчитування» інформації на ДНК.

По-друге, у ДНК, зв'язаної з білками, кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ збільшується в порівнянні з вільною ДНК. Наприклад, у Аподібних нуклеотидів у комплексах кількість нуклеотидів з «переключеним» цукрофосфатним остовом на 20% перевищує кількість таких нуклеотидів у вільній ДНК, а в разі нуклеотидів, що містять гуанін, це збільшення становить 53%.

Тому можна припустити, що конформаційні переходи цукрофосфатного остову стимулюються зв'язуванням з білками. Комплексоутворення з білками, ймовірно, знижує енергетичний бар'єр переходів. Тобто, здатність конкретного фрагмента ДНК до переходу в альтернативну конформацію кута γ , або енергетична «ціна» такого переходу, може бути критерієм відбору (або одним з факторів впізнавання).

Аналогічний механізм грає важливу роль у селективному зв'язуванні антибіотиків з рибосомальною РНК, коли висока варіабельність цукрофосфатного остову і здатність до утворення нестандартних конформацій є дискримінаційними факторами при відборі молекулами антибіотиків конкретних сайтів зв'язування серед тисяч схожих послідовностей [51]. Крім того, ключовими факторами непрямого впізнавання білками «своїх» сайтів зв'язування на ДНК є відмінності в здатності до конформаційних перебудов конкретних послідовностей ДНК і залежить від послідовності енергії В→А [82], ВІ→ВІІ [109, 119, 144] і В→ В' [108, 130] переходів.

Важливо, що схильність до конформаційних переходів кута $\gamma \in$ сиквенсспецифічною. Наприклад, комбінація А-подібної упаковки дезоксирибози і tконформації кута γ типова для нуклеотидів, що містять пурини, а комбінація Вподібної упаковки і g- конформації кута γ більш характерна для піримідинових нуклеотидів.

Виявлено також, що нуклеотиди з комбінацією А-подібної упаковки дезоксирибози і *t* конформацією кута γ утворюють найбільшу кількість контактів з білками в малому жолобку і відносно високий у великому жолобку. Тому передбачається, що для певних класів білків такі перебудови цукрофосфатного остову можуть бути ключовими при впізнаванні свого сайту зв'язування на ДНК з подальшим утворенням специфічного комплексу.

Для кращої демонстрації ролі конформаційних переходів кута у в білковонуклеїновому впізнавання і комплексоутворенні можна привести структури деяких комплексів з дослідженої вибірки.

4.6.1. Комплекс рестрикційної ендонуклеази EcoRV з ДНК (PDB id 1SX5).

Рестрикційна ендонуклеаза впізнає свій сайт 5'-GATATC-3' з подвійною симетрією і розрізає фосфодіефірний зв'язок на центральному ТА кроці (рис. 4.11 а, b, стереозображення комплексу приведено в додатку, рис. 1) [196].

Вигин ДНК 50% у великий жолобок на цьому кроці є необхідним для більш правильного розташування каталітичних бічних ланцюгів і двовалентних іонів металів, які розрізають подвійну спіраль вздовж фосфатів, і запобігає утворенню H-зв'язків між функціональними групами амінокислотних залишків і основами. Центральний ТА крок впізнається за механізмом непрямого впізнавання, комплекс стабілізується великою кількістю неспецифічних білково-нуклеїнових контактів [197].



Рисунок 4.11. Комплекс EcoRV-ДНК (PDB id 1SX5). (а) Фрагмент комплексу; Аподібні нуклеотиди, що містять аденін A4 (X) і A4 (Y) протилежних ланцюгів ДНК (напрямки 5'-3' і 3'-5', відповідно), що мають *t* конформацію кута γ , представлені як Balls; атоми O3', C5', O5' цукрофосфатного остову і атоми N амінокислот виділені червоним (1), помаранчевим (2), зеленим (3) і блакитним (4) кольорами, відповідно. Чорна лінія з'єднує центри пар основ і показує злам осі ДНК; стрілки вказують на місця розрізання подвійної спіралі ДНК. На рисунку показаний фрагмент білка; виділені амінокислотні залишки K119 (LYS) і N120 (ASN) ланцюгів A і B, які безпосередньо контактують з A4 (X) і A4 (Y). (b) Послідовність ДНК в комплексі; зеленим кольором і рамкою виділено сайт впізнавання, стрілки вказують на місце розрізання подвійної спіралі. (c) Конформації нуклеотидів, які визначаються за величинами кута псевдообертання дезоксирибози P (A- або B-подібні) і кута γ ; значення ПДП атомів C5', O3', O5' в малому і великому жолобках; AN (X) і AN (Y) – нуклеотиди протилежних ланцюгів ДНК, що містять аденіни.

Нуклеотид, що містить аденін, (положення ± 4 обох ланцюгів ДНК) в сайті зв'язування має альтернативну *t* конформацію кута γ і А-подібну упаковку дезоксирибози, які роблять полярно-неполярний профіль ДНК «впізнаваним» у малому жолобку, що, ймовірно, сприяє реалізації непрямого впізнавання сайту зв'язування.

Висока ПДП атомів ОЗ' і О5' нуклеотидів, що містять аденін (А4), в малому жолобку (рис. 4.11с) сприяє утворенню електростатичних контактів з атомами азоту амінокислот ASN (N120) LYS (K119) (рис. 4.11а), які стабілізують вигин ДНК.

4.6.2. Комплекс рестрикційної ендонуклеази ThaI з ДНК ((PDB id 3NDH).

Рестрикційна ендонуклеаза ThaI PD-(D/E) XK типу II розрізає в сайті зв'язування ДНК $d(GTACGCGAT)_2$ послідовність CG/CG ДНК (центральний CG крок, рис. 4.12а, b; стереозображення комплексу приведено в додатку, рис. 2).

Білки цього типу при утворенні комплексів зі «своїм» сайтом зв'язування використовують сиквенс-специфічну деформобільность ДНК і комбінацію прямого і непрямого механізмів впізнавання. Фрагмент ThaI розташовується в малому жолобку і утворює один специфічний H-зв'язок з основами, а решта специфічних H-зв'язків формуються у великому жолобку, один з яких – між групами гуаніну в складі нуклеотиду G7 і аминогрупою залишку лізину (Lys104, [198]). При цьому взаємодія ThaI-ДНК викликає суттєві перебудови подвійної спіралі ДНК: подвоєння Rise в CG кроці і розкручування подвійної спіралі. Нуклеотиди, що містять гуанін (G7) у сайті зв'язування мають В-подібну дезоксирибозу і альтернативну конформацію *g*- кута γ (рис. 4.12b). Його цукрофосфатний остов контактує з білком і формує електростатичні взаємодії з воднем аміногруп аргініну (ARG53), оскільки ПДП атома O5' в малому жолобку істотно збільшилася через перехід в альтернативну конформацію кута γ (рис. 4.12с).

(a) (74) (74) (74) (74) (74) (74) (74) (75) (75) (75) (75) (75) (75) (75) (75			GT		(b) 5 (C) (C) (C) (C) (C) (C) (C) (C)	, 0 页, 0 〉 ① 〉 ④ 2 <u> </u>				
						ПДІ	I, Å ²			
	(0	:)		Ma	лий жол	обок	Велин	кий жо	лобок	
	Ν	Р	γ	C5'	O3'	05'	C5'	O3'	O5'	
	G7(X)	B	g-	0.0	4.8	2.4	11.4	0.3	0.0	
	G7(Y)	B	g-	0.0	3.16	4.6	13.2	0.0	0.0	

Рисунок 4.12. Комплекс рестрикційної ендонуклеази ThaI з ДНК (PDB id 3NDH): (а) фрагмент комплексу. В-подібні нуклеотиди, що містять гуанін G7 (X) і G7 (Y) протилежних ланцюгів ДНК (напрямки 5'-3 'i 3'-5', відповідно), що мають *g*конформацію кута γ , представлені як Ball; O3', C5', O5' атоми цукрофосфатного остову і атом N амінокислот виділені червоним (1), помаранчевим (2), зеленим (3) і блакитним (4) кольорами відповідно. Стрілки вказують на місце розрізання ДНК. На рисунку показаний фрагмент білка; виділені амінокислотні залишки R53 (ARG) ланцюгів A і B білка, які безпосередньо контактують з G7 (X) і G7 (Y), утворюючи симетричні контакти. (b) Послідовність ДНК в комплексі; зеленим кольором і рамкою виділено сайт впізнавання ДНК, стрілки вказують на місце розрізання. (c) Конформації нуклеотидів, які визначаються за величинами кута псевдообертання дезоксирибози P (A- або B-подібні) і кута γ ; значення ПДП атомів C5', O3', O5' в малому і великому жолобках. GN (X) і GN (Y) – нуклеотиди протилежних ланцюгів ДНК, що містять гуанін.

4.6.3. Комплекс рестрикційної ендонуклеази PvuII з ДНК(PDB id 3PVI).

Білок PvuII - найменший представник класу рестрикційних ендонуклеаз, який зчитує послідовність d(CAGCTG)₂ і розрізає ДНК в центральному GC кроці (рис. 4.13а, b; стереозображення комплексу приведено в додатку, рис. 3).

Q33 N35 T8			32	(b) 5 (b) (A) (T) (T) (T)				® ⑦ ⑦ ⑥ ② ② ○ ④	
<i>.</i> .					ПДП	, Å ²]
(c)			Мал	ий жоло	бок	Велик	ий жоло	обок	
Ν	Р	γ	C5'	03'	O5'	C5'	03'	O5'	1
T8(X)	Α	t	7.3	5.2	2.2	14.2	0.0	0.0]
T11(X)	А	g+	21.6	6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	
T8(Y)	Α	t	7.4	4.6	2.9	13.6	0.0	0.0	1

Рисунок 4.13. Комплекс рестрикційної ендонуклеази PvuII з ДНК (PDB id 3PVI). (A) Фрагмент комплексу. А-подібні нуклеотиди, що містять тимін Т8, Т11 протилежних ланцюгів ДНК (напрямки 5'-3 'чи 3'-5', відповідно), представлені як Ball; атоми ОЗ', C5', O5' цукрофосфатного остову і атоми N амінокислот виділені червоним (1), помаранчевим (2), зеленим (3) і блакитним (4) кольорами, відповідно. На рисунку показаний фрагмент білка; виділені амінокислотні залишки N35 (ASN) і Q33 (GLN) ланцюгів A і B білка, які безпосередньо контактують з T8 (X), T8 (Y), утворюючи симетричні контакти. (b) Послідовність ДНК в комплексі; зеленим кольором і рамкою виділено сайт впізнавання ДНК. (с) Конформації нуклеотидів, які визначаються за величинами кута псевдообертання дезоксирибози Р (А- або Вподібні) і кута у; значення ПДП атомів С5', О3', О5' в малому і великому жолобках. TN (X) і TN (Y) – нуклеотиди протилежних ланцюгів ДНК, що містять тимін.

23.3

1.3

0.0

1.0

8.1

0.0

A

T11(Y)

 g^+

Впізнавання сайту зв'язування білком відбувається у великому жолобку: два антипаралельні β-ланцюги білка взаємодіють з фрагментом ДНК. Ще одне місце зв'язування розташовується в малому жолобку. При цьому бічні радикали амінокислотних залишків двох глутамінів і аспарагіну (GLN33-ASN34-GLN35)

розташовуються в порожнині сайту зв'язування ДНК, яка утворюється в малому жолобку, і формують прямі контакти з цукрофосфатним остовом [199]. Це електростатичні взаємодії між атомами аміногруп залишків глутаміну (GLN) і аспарагіну (ASN) і атомами O5', O3' нуклеотидів, що містять тимін (T8 i T11), площа доступної поверхні яких у малому жолобку істотно збільшується після переходу цих нуклеотидів в А-форму дезоксирибози (T8, T11) та *t* конформацію кутів γ (T8, рис. 4.13b).

Такі структурні зміни нуклеотидів у сайті зв'язування і білково-нуклеїнові контакти сприяють правильній орієнтації каталітичного центру білка щодо ДНК.

Якщо підсумувати результати аналізу структур наведених вище конкретних білково-нуклеїнових комплексів, можна стверджувати, що перебудова цукрофосфатного остову навіть на рівні одного нуклеотиду, динуклеотидних кроків або пари нуклеотидів може сприяти реалізації непрямого механізму впізнавання і додатково стабілізувати комплекс.

На основі всіх результатів, представлених у розділі 4, можна зробити наступні висновки.

Аналіз структур білково-нуклеїнових комплексів показує, що сиквенсспецифічна схильність до конформаційних перебудов цукрофосфатного остову («перемикання» кута ү і/або дезоксирибози) ділянок ДНК в сайтах зв'язування з білками може бути структурним «кодом» для «зчитування» білками «своєї» послідовності ДНК за механізмом непрямого впізнавання. Такий структурний код сприяє формуванню комплементарної білково-нуклеїнової поверхні, яка може бути специфікована Н-зв'язками, ван-дер-ваальсовими і гідрофобними взаємодіями між амінокислотами і основами ДНК, забезпечуючи більшу спорідненість при утворенні білково-нуклеїнових комплексів.

РОЗДІЛ 5

СИКВЕНС-СПЕЦИФІЧНІСТЬ І ХАРАКТЕР РОЗПОДІЛУ АЛЬТЕРНАТИВНИХ КОНФОРМАЦІЙ КУТІВ α/γ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ НУКЛЕОСОМНОЇ ДНК

Метою досліджень, результати яких представлені в розділі 5 «Сиквенсспецифічність і характер розподілу альтернативних конформацій кутів α/γ цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК», є стислий огляд сучасних уявлень щодо структури нуклеосом і принципів її самоорганізації, а також наведення результатів обчислення і аналізу даних про частоту, сиквенс-специфічність і особливості розподілу класичних і альтернативних конформацій пари торсійних кутів α/γ цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК для з'ясування ролі таких переходів у «підгонці» структури подвійної спіралі ДНК в процесі формування нуклеосоми (її самоорганізації, якщо розглядати нуклеосому як приклад наноструктури живої клітини), а також при впізнаванні нуклеосомної ДНК іншими білками.

5.1. Рівні компактизації ДНК в клітині і структура нуклеосом.

Загальна довжина молекул ДНК в ядрі клітин еукаріот складає від 9,2 мм (Yeast, S. cerevisiae) до 2 м (Human, H. sapiens) і ≈28 м у саламандри (Salamander, A. tigrinum, axolotl). Очевидно, необхідні спеціальні механізми упаковки такої протяжної ДНК в ядрі мікронних розмірів. При цьому ДНК повинна виконувати дві основні функції. По-перше, утворити стабільну компактну структуру, і, по-друге, зберігати доступність сайтів зв'язування білків для успішної реалізації процесів реплікації і транскрипції в строго визначені моменти часу [200, 201]. Ці альтернативні завдання можуть вирішуватися завдяки тому, що ДНК в ядрі клітини існує як компактний, але динамічний нуклеопротеїновий комплекс – хроматин.

Організація хроматину має кілька структурних рівнів (рис.5.1). На першому рівні компактизації вся ядерна ДНК (рис. 5.1а) утворює елементарну повторювану одиницю – нуклеосому (рис.5.1б) [84, 202].

Нуклеосома – це наноструктура, яка представляє собою перший рівень компактизації ДНК в клітинах еукаріот з коефіцієнтом компактизации ≈ 6 -7 [119, 203]. Така істотна зміна лінійних розмірів ДНК досягається за рахунок електростатичних взаємодій молекули ДНК як поліаніону з позитивно зарядженими бічними ланцюгами білків (гістонів), які утворюють «серцевину» нуклеосоми, і поліморфізму подвійної спіралі ДНК – її конформаційної мобільності і сиквенс-специфічної деформації.



Рисунок 5.1. Схема рівнів упаковки ДНК в клітинах еукаріот. Праворуч приведена шкала розмірів. У еукаріот, клітинах (а) подвійна спіраль накручується на гістоновий кор і утворює нуклеосому; (б) за допомогою лінкерних ДНК і гістону H1 утворюється нуклеосомна «нитка» (в), хроматінова фібрила (г) утворює петлі (д), хромосоми (е) утворюють конденсовану форму під час мітозу (ж).

Згідно з даними рентгеноструктурного аналізу [84, 119, 204] нуклеосома складається з коровою і лінкерних частин (рис. 5.2). До складу коровою частки нуклеосом входить гістоновий октамер, утворений димерами гістонів Н2А і Н2В, Н3 і Н4, і навитих навколо нього 145 – 147 пар основ ДНК, що утворюють ≈1.65 обороту лівої суперспіралі. Лінкерні ДНК (10-80 пар основ) і лінкерний гістон Н1 служать для з'єднання сусідніх корових частинок між собою у впорядковану нуклеосомну нитку розміром 10 – 12 нм (рис.5.1в) («намистинки на нитці» або «beads on a string») [205-207].

На другому рівні компактизації полінуклеосомний ланцюг утворює фібрилу товщиною 30 нм (рис.5.1г). На третьому рівні компактизації хроматинова фібрила, у свою чергу, формує петлі з 20 – 200 тис. пар основ [208], кінці яких жорстко закріплені на скелетних структурах ядерного матриксу (рис.5.1д).



Рисунок 5.2. Структура нуклеосоми (PDB id 1KX5): гістони (a) H3, (b) H4, (h) H2B, (i) H2A; димери (c) H3-H4 i (g) H2A-H2B; (D) тетрамер H3-H4; (e) тетрасома; (f) гістонові октамер 2 (H3-H4) +2 (H2A-H2B); (j) нуклеосома. Показані α -спіралі, петлі (L1, L2), N – (α N) ³ C – (α C) кінці поліпептидних ланцюгів.

На четвертому рівні компактизації хроматин у конденсованому стані утворює метафазні хромосоми (рис.5.1е). При цьому на початку мітозу (поділу клітини) хроматиновий комплекс, або хромосома, що складається з довгої молекули ДНК і білків, ще більш компактизується і утворює мітотичну хромосому, деталі структурної організації якої все ще не з'ясовані [209, 210].

5.2. Самоорганізація нуклеосом.

Необхідно відзначити, що отримання даних про тонку структуру нуклеосом можливо завдяки їх здатності до самоорганізації як *in vivo*, так і *in vitro*. У даний час отримано і розшифровано понад 40 структур нуклеосом [211, 212]. Процедура отримання нуклеосом шляхом самоорганізації для проведення кристалографічних експериментів описана в розділі 2 (див. також [213 - 216]).

In vivo, нуклеосоми утворюються за допомогою білків, які формують хроматин (chromatin assembly factors), і гістонових шаперонів [217-221], які спільно контролюють процес упорядкування гістонів і коригують правильне розташування ДНК щодо гістонових корів [222].

In vitro, можна модулювати процеси самоорганізації нуклеосом *in vivo* [223] поступово зменшуючи іонну силу розчину, що містить ДНК і гістони, з 2М до фізіологічної іонної сили або нижче з використання покрокового («step-by-step») діалізу [212, 224, 225]. Оскільки у фізіологічних умовах електростатичні взаємодії між поліаніоном ДНК і позитивно зарядженим гістоновим кором дуже великі, утворення комплексу ДНК-кор є практично незворотнім.

Запропоновано кілька схем самоорганізації нуклеосом *in vitro* [226-228]. Самоорганізація нуклеосом – це послідовний процес, який починається взаємодією між гістонами НЗ-Н4 (тетрамером або гетеродимером [229]) і ДНК з наступним об'єднанням цього комплексу і двох димерів Н2А-Н2В через кілька проміжних станів (рис.5.3): І \rightarrow II \rightarrow (III або IV) \rightarrow V [222, 230]. Можливе утворення перехідних станів між нуклеосомою (V) і вільною ДНК, димером Н2А-Н2В і тетрамером (НЗ-Н4)₂ (I) (рис.5.3).



Рисунок 5.3. Схема самоорганізації (дисоціації) нуклеосом I \leftrightarrow II \rightarrow (III або IV) \leftrightarrow V з утворенням декількох альтернативних проміжних структур (рівноважні константи K1, K2 наведені в [226]; K_{o/c} – в [228]; K_{eq}^{conf} – в [231]).

Дисоціація проходить, як правило, зворотнім шляхом [8] теж як послідовний процес (рис.5.3): ($V \rightarrow II \rightarrow I$) або ($V \rightarrow III \rightarrow II \rightarrow I$). Стадія III представляє відкритий стан, в якому взаємодії між димером H2A-H2B і тетрамером (H3-H4)₂ практично зникають.

5.3. Особливості конформації цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК.

Нуклеосомна ДНК зберігає В-форму подвійної спіралі, але її конформаційні параметри відрізняються від класичної В-ДНК і визначаються необхідністю згортання подвійної спіралі ДНК у ліву суперспіраль [211]. Зокрема в структурі нуклеосом широко представлені некласичні конформації цукрофосфатного остову. Наприклад, нуклеосома (PDB id 1KX5) (рис.5.4), у ДНК якої спостерігається регулярне чергування ВІ і ВІІ конформацій, що змінюються при прямих білковонуклеїнових взаємодіях до більш деформованих В-конформерів. Ці конформери характеризуються перемиканнями торсійних кутів α +1 і γ +1 («перемкнена» ВІ-ДНК) і декількома нуклеотидами, у яких зафіксовано істотний розкид значень кутів ζ і α + 1.



Рисунок 5.4. (а) Стереозображення нуклеосоми (PDB id 1KX5); (б) у структурі ДНК нуклеосоми виділені нуклеотиди (червоний), що мають ВІІ конформацію.

Конформація пари кутів α/γ корелює з локальними спіральними параметрами: альтернативні конформації пари кутів α/γ:*t/t* завжди характеризується малим

значенням Twist і позитивним значенням Roll. Друга альтернативна комбінація кутів α/γ :*g*+/*g*- не має такої залежності і не викликає змін середніх значень Twist і/або Roll [58].

Можна припустити, що в нуклеосомі нуклеотиди з альтернативними конформаціями цукрофосфатного остову (принаймні, пари кутів α/γ) можуть бути важливі не тільки для забезпечення оптимальних умов взаємодії з гістонами, але і для непрямого впізнавання іншими білками «своїх» сайтів на нуклеосомній ДНК. Відомо, що нуклеосоми безпосередньо взаємодіють з полімеразами, факторами транскрипції і хроматин-ремодулюючими факторами [232-234].

5.4. Частота і сиквенс-специфічність конформаційних переходів кутів α/γ нуклеосомної ДНК.

На першому етапі дослідження ми визначили кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута α і/або γ . Відсоток нуклеотидів у нуклеосомній ДНК з класичною g+ і альтернативними t або g- конформаціями кута γ становить 87,5%, 7,1% і 5,4%, відповідно; відсоток нуклеотидів з класичною g- і альтернативними g+, t конформаціями кута α становить 91,8%, 6,2% і 2,0%, відповідно. Загальний відсоток нуклеотидів з перемкненими кутами γ і α в нуклеосомній ДНК близький до такого, що спостерігається в комплексах білків з короткими фрагментами ДНК. Але нуклеосомна ДНК має високий вміст нуклеотидів з кутом γ в альтернативній g- конформації і кутом α в альтернативній g+ конформації в порівнянні з вільною ДНК і короткими фрагментами ДНК в комплексах з білками.

Аналіз частот переходів кутів α/γ в альтернативні конформації показав сиквенс-специфічність таких структурних змін (таблиця 5.1). У нуклеосомній ДНК *g*- конформація кута γ частіше зустрічається у нуклеотидів, що містять тимін і цитозин, але для *t* конформації кута γ сіквенс-специфічності переходів не виявлено. Альтернативна *g*+ конформація кута α краща для нуклеотидів, що містять тимін, а *t* конформація – для нуклеотидів, що містять аденін. Ми розглянули різні комбінації кутів α/γ в нуклеосомній ДНК (таблиця 5.1) і порівняли їх з даними для коротких фрагментів вільної ДНК [58, 60] і ДНК у комплексі з білками [58]. Такий аналіз дозволив нам встановити додаткову t/g+ комбінацію конформацій кутів α/γ в нуклеосомній ДНК, яка раніше не спостерігалася. Навпаки, *g-/t* комбінація конформацій кутів α/γ , яка присутня в інших типах білковонуклеїнових комплексів [207], не була виявлена у нуклеосомної ДНК.

Таблиця 5.1

	Усі нуклеотиди	А	С	G	Т				
	% від загальної кількості нуклеотидів	% від числа нуклеотидів у кожній конформації							
Конформації кута у:									
g+	87.5	30.5	20.1	20.9	28.5				
g-	7.1	17.4	22.8	15.6	44.2				
t	5.4	26.9	24.5	25.0	23.6				
		Конформації	кута а:						
g+	6.2	17.9	19.3	17.0	45.7				
g-	91.8	29.2	20.6	21.0	29.1				
t	2.0	34.2	31.5	6.8	27.4				
	Комбі	нації конформ	ацій кутів $lpha/\gamma$						
<i>g-/g</i> +	91.9	29.3	20.7	21.4	28.7				
g+/g-	5.3	15.7	21.1	13.0	50.3				
t/t	1.5	19.2	42.3	9.6	28.8				
<i>t/g</i> +	0.6	71.4	4.8	0.0	23.8				
<i>g</i> +/ <i>t</i>	0.7	40.0	12.0	36.0	12.0				

Число нуклеотидів (%) з різними конформаціями пари кутів α / γ і їх

-	<u> </u>	
можпивих	комотна	T11/
monum	Romonia	ции

Для конформаційних переходів кутів α/γ спостерігається сиквенсспецифічність. Існують наступні переважні комбінації кутів α/γ : g+/g- для нуклеотидів, що містять тимін; t/t - для нуклеотидів, що містять цитозин; t/g+ - длянуклеотидів, що містять аденін; g+/t - для нуклеотидів, що містять аденін і гуанін (таблиця 5.1).

Таким чином, можна припустити, що структурні перебудови нуклеосомної ДНК виникають внаслідок необхідності згортання ДНК в суперспіраль, що накладає певні обмеження на конформацію цукрофосфатного остову ДНК.

5.5. Площі доступної поверхні атомів нуклеосомної ДНК. Полярність жолобків нуклеосомної ДНК.

За допомогою алгоритму, наведеного в підрозділі 2.4, розраховані абсолютні значення площі доступної поверхні (ПДП) кожного атома нуклеосомної ДНК, експонованих у малий або великий жолобки. За цими даними була проведена оцінка загальної полярної і гідрофобної ПДП атомів основ і цукрофосфатного остову в малому і великому жолобках. Середні значення ПДП для всіх розглянутих нуклеотидів наведені в таблиці 5.2. На рисунку 5.5 представлені значення співвіднощення полярної/гідрофобної ПДП.



Рисунок 5.5. Співвідношення середньої полярної/гідрофобної ПДП атомів, експонованих у великий і малий жолобки для нуклеотидів з різними конформаціями кута у нуклеосомної ДНК.

Нуклеотиди з класичною g+ конформацією кута γ нуклеосомної ДНК (рис.5.5, таблиця 5.2), як і аналогічні В-подібні нуклеотиди вільної ДНК (див. рис.3.1 і таблицю 3.3) та у ДНК в комплексах з білками (див. рис. 4.6, 4.7 і таблицю 4.7) мають співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів більше 1 у великому жолобку і менше 1 у малому жолобку.

129

Абсолютні значення полярної і гідрофобної ПДП (Å²) у великому і малому жолобках для В-подібних нуклеотидів з різними конформаціями кута у для нуклеосомної ДНК.

Цукрофосфатний остов												
жолобок		малий										
кут ү	g+	g-	t	g+	g-	t						
нуклеотид												
	Полярна ПДП, А́ ²											
середнє	47.0	46.9	42.3	34.5	49.6	43.1						
А	48.3	46.9	44.4	33.9	49.2	42.1						
С	46.1	44.8	42.0	34.9	49.8	44.1						
G	46.9	45.9	41.0	35.0	53.7	43.9						
Т	46.2	48.3	41.5	34.4	48.5	42.5						
Гідрофобна ПДП, Å ²												
середнє	11.0	11.1	27.7	44.9	26.7	23.9						
А	10.1	8.9	26.9	48.3	30.5	25.9						
С	11.9	12.3	29.3	41.5	25.5	19.7						
G	13.1	12.6	26.0	45.6	26.7	30.1						
Т	9.5	11.0	28.8	43.0	26.0	19.6						
Основи												
жолобок		великий	Í	малий								
кут ү	g+	g-	t	g+	g-	t						
нуклеотид												
		Полярна	. ПДП, $Å^2$									
середнє	11.6	9.4	10.6	6.7	6.2	7.3						
А	15.0	14.1	14.4	3.8	3.6	3.5						
С	10.2	10.7	7.8	4.8	4.5	6.5						
G	15.7	13.4	14.1	13.0	13.5	13.0						
Т	5.5	5.7	5.4	6.4	6.1	6.9						
]	Гідрофобн	на ПДП, Å	2								
середнє	19.5	26.5	19.2	1.6	0.8	1.5						
А	7.3	8.1	7.8	5.0	4.7	4.5						
С	20.8	22.0	19.7	0.1	0.0	0.1						
G	9.9	9.4	9.1	0.3	0.1	0.6						
Т	39.8	40.8	41.2	0.1	0.0	0.2						

У нуклеосомної ДНК також фіксується сиквенс-специфічність полярногідрофобного профілю обох жолобків. Нуклеотиди з класичною *g*+ конформацією кута *γ*, що містять пурини, мають більш високе співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів у великому жолобку завдяки великим значенням ПДП полярних атомів основ (аденіну і гуаніну) і великим значенням ПДП гідрофобних атомів цитозину і тиміну. У малому жолобку нуклеотиди, що містять аденін, мають найменше співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів цукрофосфатного остову.

Перехід у альтернативні конформації кута у нуклеосомної ДНК викликає суттєві зміни полярно-гідрофобного профілю малого жолобка, які і у ДНК в комплексах з білками. Спостерігається збільшення співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів (воно стає більше 1) завдяки одночасному збільшенню абсолютних значень ПДП полярних і зменшення ПДП гідрофобних атомів цукрофосфатного остову ДНК.

У великому жолобку перехід $g + \rightarrow g$ - не викликає значних змін у співвідношенні полярної/гідрофобної ПДП атомів, тоді як перехід у t конформацію кута γ призводить до зменшення співвідношення полярної/гідрофобної ПДП атомів завдяки насамперед зростанню ПДП гідрофобних атомів цукрофосфатного остову.

Треба відзначити, що у нуклеосомної ДНК сиквенс-специфічність змін полярно-гідрофобного профілю жолобків при переході кута у в альтернативні конформації визначається нуклеотидами, які містять піримідини, а найбільш суттєві зміни ПДП атомів спостерігаються у нуклеотидів, які містять тимін.

Таким чином, як і для фрагментів вільної ДНК та коротких сайтів ДНК у комплексах з білками, у нуклеосомної ДНК при конформаційних переходах в альтернативні конформації кута у малий жолобок стає більш полярним, а великий жолобок – більш гідрофобним, у результаті одночасних протилежних змін ПДП полярних і гідрофобних атомів цукрофосфатного остову. Такі зміни полярногідрофобного профілю обох жолобків є сиквенс-специфічними.

Підсумовуючи результати щодо структурних особливостей цукрофосфатного остову та полярного профілю жолобків нуклеосомної ДНК можна зробити висновок про суттєву роль конформаційних переходів насамперед кута у як у забезпеченні підгонки подвійної спіралі для формування суперспіралі на гістоновому корі, так і для покращення стабільності нуклеосоми в результаті зміни полярності жолобків і забезпечення контактів між негативно зарядженими сайтами ДНК та позитивно зарядженими гістонами або іншими білками, які зв'язуються з нуклеосомною ДНК [232-234].

5.6. Характер розподілу нуклеотидів з альтернативними конформаціями цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК.

На наступному етапі дослідження ми порівняли розташування нуклеотидів з переключеним кутом γ на поверхні суперспіралі нуклеосоми і виявили, що, незважаючи на схожі методи отримання фрагментів ДНК для самоорганізації нуклеосоми (див. підрозділ 2.2), розташування нуклеотидів з альтернативними конформаціями у всіх розглянутих 16 нуклеосом унікально. Але існує два основних способи розташування таких нуклеотидів (рис. 5.6).



Рисунок 5.6. Розташування нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ (*t* – червоний, *g*- – блакитний) для двох груп нуклеосом: (а) переважно на «зовнішній» поверхні ДНК (PDB id 1KX5, 1PYO, 1EQZ); (б) рівномірний розподіл на «зовнішній» і «внутрішній» поверхні суперспіралі ДНК (PDB id 1M18, 1F66, 1P3L).

У першої групи нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута у переважно розташовуються на «зовнішній» поверхні нуклеосоми (78±22% перемкнених нуклеотидів, рис. 5.6а).

До другого типу відносяться структури з рівномірним розподілом нуклеотидів з альтернативними конформаціями на «внутрішній» і «зовнішній» поверхні нуклеосоми. На «зовнішній» поверхні суперспірали ДНК знаходиться 51±1% перемкнених нуклеотидів, 49±1% таких нуклеотидів розташовані на «внутрішній» поверхні гістонового кору нуклеосоми (рис. 5.6б).

Ми визначили загальну кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями пари кутів α/γ у кожній позиції обох комплементарних ланцюгів нуклеосомної ДНК для всіх досліджуваних структур нуклеосом (рис. 5.7).



Рисунок 5.7. Число нуклеосом з альтернативними конформаціями кутів γ (а) і α (б) у певній позиції кожного з двох комплементарних ланцюгів ДНК. Вигини ДНК в великий і малий жолобки ДНК виділені рожевим і блакитним кольорами, відповідно. Відсоток нуклеотидів розраховувався для нуклеосом довжиною 146 пар основ.

б

Було отримано, що більшість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ розташовані в сайтах вигину ДНК у жолобки або біля них (рис. 5.7а). Для кута α такі закономірності розташування нуклеотидів з альтернативними конформаціями не спостерігаються (рис. 5.7б).

Ми також встановили двадцять «консервативних» положень нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута у (таблиця 5.3, рис. 5.8).

Таблиця 5.3.

«Консервативні» положення (N) нуклеотидів у нуклеосомної ДНК з класичною *g*+ (24%) і альтернативними *g*- (39,7%) або *t* (36,3%) конформаціями кута γ для 16 стуктур нуклеосом; наведено PDB іd структур нуклеосом.

Ν	6	22	29	34	48	94	114	134	149	152	175	198	227	243	248	258	262	268	287	289
PDB id																				
1P3L	Τ	С	Α	Τ	Т	G	С	G	С	Τ	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1KX3	Т	C	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1\$32	Т	C	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
2NQB	Т	C	Α	Τ	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1ZLA	Τ	С	Α	Τ	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1M18	Т	C	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
2CV5	Т	С	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
3C1B	Т	C	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1F66	Т	C	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
1P3I	Т	С	Α	Т	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
1M19	Т	C	Α	Τ	Т	G	C	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1M1A	Τ	C	Α	Τ	Т	G	С	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Τ	С	G	Α	Т
1EQZ	Т	С	Α	Т	Т	G	C	G	С	Т	Α	Т	G	G	Α	Т	C	G	Α	Т
2PYO	Т	C	Α	Т	Т	Т	Α	Α	Α	Α	Α	С	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
1KX5	Т	С	Α	Т	Т	Т	Α	Α	Α	Α	Α	C	G	G	Α	Т	С	G	Α	Т
1KX4	C	A	Α	G	G	G	Т	G	С	С	Α	Т	G	Α	Α	Α	Т	С	G	Α

Слід відзначити, що з 16 розглянутих структур нуклеосом 4 мають у консервативних положеннях більшість нуклеотидів з класичною конформацією кута γ : 1KX4 – 18 нуклеотидів, 2PYO і 1KX5 – 15 нуклеотидів та 1EQZ – 12 нуклеотидів з 20 позицій. Дійсно, саме ці структури відрізняються від інших послідовністю (1KX4) або довжиною (2PY0, 1KX5) нуклеосомної ДНК (див. підрозділ 2.2 та рис.2.2). У той же час у 4 структурах (1P3L, 1KX3, 1S32 і 2NQB) всі нуклеотиди в консервативних положеннях мають альтернативні конформації кута γ .

Треба відзначити, що консервативні положення 48 у першому ланцюгу та 268 у другому ланцюгу нуклеосомної ДНК співпадають з положенням альтернативних нуклеотидів у сайтах вигину подвійної спіралі у бік малого жолобка, тоді як консервативні положення 22, 94, 114 у першому ланцюгу та 198 у другому ланцюгу співпадають з положенням альтернативних нуклеотидів у сайтах вигину подвійної спіралі у бік великого жолобка. Консервативні положення 29, 34, 134 першого ланцюга та 175, 227, 243, 248, 258, 262 другого ланцюга розташовуються між жолобками. Наявність альтернативних нуклеотидів у консервативних положеннях 6, 149, 152 на початку першого і другого ланцюгів, відповідно, і в положення 287, 289 у кінці другого ланцюга можна пояснити кінцевими эффектами – початком та завершенням «закручування» ДНК у ліву суперспіраль.

Для 12 структур нуклеосом, у яких у консервативних позиціях розташовуються саме альтернативні нуклеотиди, можна встановити певну сиквенс-специфічність таких перемикань кута у. Найчастіше у консервативних позиціях розташовані нуклеотиди, які містять тиміни: 84 з загальної кількості нуклеотидів, яка дорівнює 240 нуклеотидам. Найчастіше саме ці нуклеотиди мають альтернативні конформації (80), з яких 51 – g-, а 29 – t конформації. Другими за частотою розташування у консервативних положеннях є нуклеотиди, які містять гуаніни (60 з 240); 56 з цих нуклеотидів мають альтернативні конформації кута γ : 30 – *g*-, а 26 – *t* конформації. Нуклеотиди, які містять аденіни та цитозини, розташовуються у консервативних положеннях з однаковою частотою: 48 з 240, в альтернативних станах ці нуклеотиди теж перебувають майже з однаковою частотою: 43 та 44 нуклеотиди, відповідно. Але для нуклеотидів, які містять цитозини, альтернативна t конформація приблизно у 2 рази перебільшує кількість нуклеотидів з дконформацією: 29 і 15, відповідно. Нуклеотиди, які містять аденіни, мають майже однакову кількість двох типів альтернативних нуклеотидів: 20 – у g- i 23 – у t конформаціях кута у.

Більшість консервативних положень нуклеотидів розташовані на «зовнішній» поверхні нуклеосомної ДНК (рис. 5.8) і доступні для взаємодії з іншими білками.









1M1A



1ZLA



1KX3

2CV5



2NQB



Рисунок 5.8. «Консервативні» положення нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ (червоний); наведені PDB іd структур.

Для з'ясування ролі зафіксованих нами перебудов полінуклеотидного ланцюга нуклеосомної ДНК у формуванні структури нуклеосоми ми розрахували значення спіральних та локальних параметрів динуклеотидних кроків нуклеосомної ДНК для усіх розглянутих нами структур (таблиця 5.4).

Відомо, що для утворення ідеальної лівої суперспіралі ДНК необхідно, щоб кути Roll і Tilt періодично змінювалися уздовж подвійної спіралі з однаковою амплітудою [42]. При цьому вигин нуклеосомної ДНК виникає при накопиченні великої кількості локальних конформаційних змін спіральних параметрів Roll, Tilt,

Twist в індивідуальних кроках пар основ і нуклеосомна ДНК згинається анізотропно: величина вигину в жолобки (Roll) перевищує величину вигину в сторону цукрофосфатного остову (Tilt). Вигин у бік великого жолобка (позитивний Roll) істотно більше в порівнянні з вигином у бік малого жолобка. Крім того, у сайтах вигину в великий жолобок параметр Twist менше, а в сайтах вигину в малий жолобок Twist більше, ніж у класичної В-ДНК [195]. У нуклеосомної ДНК також спостерігається періодична зміна Slide. Коли великий жолобок повернутий до поверхні гістонів, Slide має негативні значення (~ -0.5 Å) і зсув відбувається уздовж осі нуклеосомної суперспіралі в напрямку, який відповідає утворенню лівої суперспіралі. Коли до поверхні гістонового октамеру повернутий малий жолобок, Slide має позитивні значення.

Як можна бачити з наведених у таблиці 5.4 даних, у нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ та у нуклеотидів у консервативних положеннях з *g*- або *t* конформаціям кута γ , є тенденція до такої зміни значень локальних параметрів, які можуть свідчити про додаткове полегшування деформації подвійної спіралі. Локальні параметри цих пар нуклеотидів відрізняються від таких у класичної В-форми подвійної спіралі ДНК, у якої: Roll = 1,7 ÷ -0,2° (±5,7°), Twist = 36°, Slide = 0,21±0,74 Å [43, 44, табл. 1.1, підрозділ 1.2].

Суттєвий розкид значень Roll, Twist i Slide (таблиця 5.4) можна пояснити розташуванням нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ біля вигинів у обидва жолобки або між ними, що призводить до різних за знаком змін локальних параметрів.

Таблиця 5.4

конформації кута ү	$Roll \pm SD$	Twist \pm SD	Slide \pm SD
<i>g</i> +	0.83 ± 9.31	35.57 ± 6.82	0.30 ± 0.87
<i>g</i> -	4.58 ± 11.42	33.56 ± 10.80	-0.10 ± 0.82
t	2.25 ± 8.92	35.12 ±7.27	0.26 ± 0.74
g- & t	2.00 ± 6.69	35.98 ± 5.43	0.42 ± 0.95
консервативні положення	3.91 ± 8.08	33.14 ±6.00	-0.15 ± 0.31

Середні значення параметрів Slide, Roll і Twist нуклеосомної ДНК для нуклеотидів з різними конформаціями кута ү; SD – стандартні відхилення Тому ми розглянули можливість існування кореляції між локальними параметрами Roll, Twist i Slide нуклеосомної ДНК та конформацією кута γ у певних положеннях альтернативних нуклеотидів та сайтах вигину в жолобки (рис.5.9).



В

Рисунок 5.9. Розподіл значень локальних параметрів нуклеосомної ДНК для всіх досліджених структур нуклеосом Roll (a), Twist (б) і Slide (в) відносно положень нуклеотидів та ймовірність наявності нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ : значення 10 (a,б) або 1 (в) – нуклеотиди з альтернативною конформацією кута γ в даному положенні є в усіх нуклеосомах, значення 0 – нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ в даному положенні немає в жодної нуклеосомі (a-в); показано вигини у великий (рожевий колір) та малий (блакитний колір) жолобки. Дані наведені для нуклеосом довжиною 146 пар основ. Аналіз таких залежностей показує наявність змін локальних параметрів динуклеотидних кроків у сайтах вигину в бік обох жолобків. У місцях вигину подвійної спіралі у великий жолобок значення Roll більше 0, Twist не перевищує 30° , Slide менше 0. У місцях вигину у малий жолобок значення Roll менше 0, Twist більше 36° , Slide більше 1. Саме в цих положеннях з досить високою імовірністю розташовані нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ (рис.5.9). Тобто можна стверджувати, що є взаємозв'язок між деформацією нуклеосомної ДНК та наявністю в певних положеннях нуклеотидів з альтернативними конформаціями конформаціями конформаціями з досить високою імовірністю розташовані нуклеотиди з альтернативними конформацією нуклеосомної ДНК та наявністю в певних положеннях нуклеотидів з альтернативними конформаціями конформаціями полінуклеотидного ланцюга, які характеризується перемиканням торсійного кута γ з класичного в альтернативні стани.

Ми також розглянули імовірність утворювання контактів між нуклеосомною ДНК і гістоновим кором у залежності від положення нуклеотидів відносно місць вигинів у обидва жолобки (рис. 5.10).



Рисунок 5.10. Відсоток нуклеотидів, які утворюють контакти з гістоновим кором у малому (блакитний колір) або великому (червоний колір) жолобках; пунктиром позначений відсоток нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута у в даному положенні; вигин у великий жолобок позначений червоним кольором, вигин у малий жолобок – блакитним кольором. Дані наведені для нуклеосом довжиною 146 пар основ.

Аналіз наведених на рисунку 5.10 залежностей дозволяє висунути наступні твердження.

Положення сайтів утворення максимального числа контактів не співпадає з місцями вигинів у жолобки. Вони розташовані між місцями вигинів, тоді як нуклеотиди з альтернативними конформаціями, згідно з нашими результатами, в більшості випадків розташовані саме у вигинах або поблизу них. Тобто у нуклеосомної ДНК нуклеотиди з альтернативними конформаціями в першу чергу сприяють деформації подвійної спіралі для полегшення формування лівої суперспіралі на гістоновому корі.

В той же час у положеннях 6 і 29 першого ланцюга подвійної спіралі майже 100 відсотків альтернативних нуклеотидів утворюють контакти з гістоновим кором у малому жолобку. У положеннях 4, 27, 79, 98, 120, 141 другого ланцюга більше половини альтернативних нуклеотидів утворюють контакти з гістоновим кором у малому (4, 27), великому (98) або в обох жолобках (79, 120, 141). Можна припустити, що частина нуклеотидів з альтернативними конформаціями сприяє стабілізації нуклеосоми завдяки формуванню контактів між нуклеосомною ДНК і гістоновим кором.

Таким чином, властивості конкретної послідовності ДНК, яка входить до складу нуклеосоми, визначають особливості її конформації та можливості утворення контактів з гістоновим кором. При цьому відбувається тонке пристосування конформації ДНК до поверхні октамеру гістонів згідно з загальними уявленнями про формування білково-нуклеїнових взаємодій у комплексах [17].

Одночасно значна частина нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ розташовується на поверхні нуклеосом (рис. 5.6). Їх кількість становить 15-16 нуклеотидів у нуклеосомах з переважним розташуванням альтернативних нуклеотидів на зовнішній поверхні нуклеосомної ДНК, яка не взаємодіє з гістоновим кором. У випадку відносно рівномірного розподілу альтернативних нуклеотидів на зовнішній та внутрішній поверхні, кількість таких нуклеотидів на зовнішній поверхні нуклеосомної ДНК дорівнює приблизно 10 нуклеотидам (рис.5.6б). Можна припустити, що альтернативні нуклеотиди сприяють взаємодії не тільки з гістонами, але і з іншими білками на вільних ділянках нуклеосомної ДНК за механізмом непрямого впізнавання. Підсумовуючи отримані результати можна зробити деякі узагальнення.

По-перше, нуклеосома – це нанооб'єкт, здатний до самоорганізації за принципом знизу-вгору («from the bottom up»). Цей принцип реалізується завдяки можливості електростатичних взаємодій між лінійним поліаніоном – подвійною спіраллю ДНК і позитивно зарядженим комплексом глобулярних білків – гістоновим кором.

По-друге, «накручування» полімеру на стабільний гістоновий кор відбувається при самоорганізції нуклеосоми. Це призводить до ефективного (в ≈ 6 – 7 разів) зменшення довжини лінійного полімеру з випадковою послідовністю мономерів. Основною вимогою є наявність протилежних зарядів на поверхні «ядра» і «нитки».

По-третє, динамічна поведінка нуклеосоми як нанопристроя, тобто здатність контролювати процеси самоорганізації/дисоціації нуклеосоми, робить відкриті лінійні фрагменти полімеру доступними для контактів з навколишнім середовищем.

Ключову роль в реалізації всіх представлених вище особливостей самоорганізації нуклеосом грає конформаційна варіабельність цукрофосфатного остову подвійної спіралі ДНК, що дозволяє виконати тонку «підгонку» нуклеосомної ДНК як для утворення стабільного комплексу з гістоновим кором, так і для взаємодії з іншіми полімерами (регуляторними білками) [232-234] і/або малими молекулами [235].

На підставі аналізу отриманих результатів можна сформулювати загальний висновок.

З огляду на встановлену нами конформаційну варіабельність цукрофосфатного остову ДНК у складі нуклеосом, а саме: високий вміст нуклеотидів з альтернативними конформаціями кутів α і γ; сиквенс-специфічність переходів пари кутів α/γ в альтернативні конформації; існування взаємозв'язку між деформацією подвійної спіралі, розташуванням нуклеотидів з альтернативними конформаціями вздовж нуклеосомної ДНК та утворенням контактів між нуклеосомною ДНК та гістоновим кором; високий вміст нуклеотидів з альтернативними конформаціями як на внутрішній поверхні нуклеосом, що безпосередньо взаємодіє з гістоновим кором, так і на зовнішній поверхні нуклеосом можна стверджувати, що структурна перебудова цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК на рівні зміни торсійного кута γ необхідна для деформації подвійної спіралі ДНК і її закручування у ліву суперспіраль, для стабілізації нуклеосоми та взаємодії з гістоновим кором і для непрямого впізнавання іншими білками «своїх» сайтів на зовнішній поверхні нуклеосомної ДНК.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі виконано детальний аналіз кристалографічних структур фрагментів вільної ДНК, білково-нуклеїнових комплексів і нуклеосом, що дозволило визначити вплив конформаційних перебудов цукрофосфатного остову ДНК на розміри і фізичні характеристики подвійної спіралі і їх сиквенсспецифічність, які можуть бути розглянуті як фактори, важливі для реалізації непрямого механізму білково-нуклеїнового впізнавання. Основні результати можна підсумувати таким чином:

1. Створено оригінальну базу даних, вільно доступну в Інтернеті (www.protna.bio-page.org), яка містить інформацію про конформаційні параметри фрагментів вільної ДНК, ДНК в комплексах з білками, відомості про площі доступної поверхні атомів ДНК, електростатичний потенціал малого жолобка, білково-нуклеїнові контакти.

2. За допомогою статистичного аналізу кристалографічних структур коротких фрагментів вільної ДНК вперше встановлено закономірності і сиквенсспецифічність переходів кута γ в альтернативні конформації. У фрагментів вільної В-ДНК виявлені обидві альтернативні конформації кута γ : t і g-; у фрагментів вільної А-ДНК зафіксована тільки одна альтернативна t конформація кута γ ; загальна кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ у Аподібних нуклеотидів більша, ніж у В-подібних.

3. За допомогою аналізу значень електростатичного потенціалу коротких фрагментів вільної ДНК вперше встановлена кореляція між послідовністю ДНК, структурним станом цукрофосфатного остову, шириною малого жолобка, величиною і розподілом його електростатичного потенціалу.

4. Вперше встановлено сиквенс-специфічна схильність до конформаційних перебудов цукрофосфатного остову ДНК (зміна конформації кута γ і/або дезоксирибози) в сайтах зв'язування з білками. Такі перебудови призводять до зміни полярно/гідрофобного профілю поверхні ДНК, що доступна у великому і малому жолобках: полярність малого жолобка збільшується, в той час як

полярність великого жолобка зменшується за рахунок протилежних змін полярної і гідрофобної площ доступної поверхні атомів цукрофосфатного остову, зокрема, атомів ОЗ', О5' і С5'. Показано також, що полярно/гідрофобний профіль нуклеотидів, які мають будь-яку конформацію кута γ, є сиквенс-специфічним.

5. Для ДНК в комплексах з білками вперше визначено кількість контактів між білками і нуклеотидами, які мають альтернативні конформації кута γ і/або відрізняються конформацією дезоксирибози, і їх розподіл по жолобках. Отримано докази збільшення кількості і сиквенс-специфічність білково-нуклеїнових контактів у малому жолобку, які утворюють нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ і А-подібною конформацією дезоксирибози в сайтах зв'язування з білками.

6. При дослідженні структури цукрофосфатного остову нуклеосомної ДНК вперше виявлено «консервативні» позиції нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ. Такі положення нуклеотидів можуть бути наслідком згортання ДНК в суперспіраль, що накладає певні обмеження на конформацію цукрофосфатного остову.

7. Для нуклеосомної ДНК вперше визначено високий вміст нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ , які розташовуються на зовнішній поверхні нуклеосом у сайтах вигину ДНК у жолобки, або рівномірно розподіляються на зовнішній і внутрішній поверхні ДНК, зверненої до гістонового кору. Очевидно, конформаційні перемикання кута γ необхідні як для стабільності нуклеосом, так і для впізнавання білками конкретних сайтів зв'язування на нуклеосомної ДНК.

- Double helical DNA: conformations, physical properties and interactions with ligands / [Record M.T., Mazur S.J., Melancon P., et al.] // Annu. Rev. Biochem. – 1981. – V. 50. – P. 997–1024.
- / Structure and Dynamics of Water Surrounding Biomolecules / [Saenger W.] // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. – 1987. – V. 16. – P.93-114.
- Watson J.D. A structure of deoxyribose nucleic acid / [Watson J.D., Crick F.H.C.] // Nature. – 1953. – V. 171. – P. 737-738.
- 4. Wilkins M.H. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids / [Wilkins M.H., Stokes A.R., Wilson H.R.] // Nature. 1953. V. 171. P. 738–740.
- Franklin R. E. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate / [Franklin R. E., Gosling R. G.] // Nature. – 1953. – V. 171. – P. 740–741.
- Molecular structure of a lefthanded double helical DNA fragment at atomic resolution / [Wang A.H. -J., Quigley G.J., Kolpak F.J., et al.] // Nature. – 1979. – V. 282. – P. 680–686.
- Sequence-dependent conformation of an A-DNA double helix. The crystal structure of the octamer d(G-G-T-A-T-A-C-C) / [Shakked Z., Rabinovich D., Kennard O., et al.] // Mol. Biol. – 1983. – V.166. – P.183-201.
- Kennard O. Oligonucleotide structure: a decade of results from single crystal X-ray diffraction studies / [Kennard O., Hunter W.H.Q.] // Rev. Biophys. 1989. V. 22. P. 327–379.
- 9. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA / [Wing R., Drew H., Takano T., et al.] // Nature. 1980. V. 287. P. 755–758.
- Dickerson R.E. Structure of a B-DNA dodecamer. II. Influence of base sequence on helix structure / [Dickerson R.E., Drew H.R.] // J. Mol. Biol. – 1981. – V. 149. – P. 761–786.
- 11. What do we really know about B-DNA?: Proceedings of the Sixth Conversation in Biomolecular Stereodynamics DNA and RNA, (1990 Schenectady, NY) / [Dickerson R.E.] відп. ред. Sarma, R.H. & Sarma, M.H. In: Structure and Methods, Adenine Press Vol. 3. P. 1–38.
- Goodwin D.C. Form of DNA and the nature of interactions with proteins in chromatin / [Goodwin D.C., Brahms J.] // Nucleic Acids Res. – 1978. – V. 5. – P. 835-850.
- Goodsell D.S. The crystal structure of C-C-A-T-T-A-A-T-G-G. Implications for bending of B-DNA at T-A steps / [Goodsell D.S., Kaczor-Grzeskowiak M., Dickerson R.E.] // J. Mol. Biol. – 1994. – V. 239. – P. 79–96.
- The B-DNA dodecamer at high resolution reveals a spine of water on sodium / [Shui X., McFail-Isom L., Hu G.G., Williams L.D.] // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – P. 8341–8355.
- 15. Arnott S. Optimized parameters for A-DNA and B-DNA / [Arnott S., Hukins D.W.L.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. V. 47. P. 1504–1509.

- Etheve L. Protein-DNA interfaces: a molecular dynamics analysis of timedependent recognition processes for three transcription factors / [Etheve L., Martin J., Lavery R.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – published online – September 21.
- Sequence recognition of DNA by protein-induced conformational transitions / [Watkins D., Mohan S., Koudelka G.B., Williams L.D.] // J. Mol. Biol. – 2010. – V. 396. – P. 1145-1164.
- Burkhoff A.M. The unusual conformation adopted by the adenine tracts in kinetoplast DNA / [Burkhoff A.M., Tullius T.D.] // Cell. – 1987. – V. 48. – P. 935–943.
- Alexeev D.G. Poly(dA)-poly(dT) is a B-type double helix with a distinctively narrow minor groove / [Alexeev D.G., Lipanov A.A., Skuratovskii I.Y.] // Nature. - 1987. - V. 325. - P. 821-823.
- Ordered water structure around a B-DNA dodecamer. A quantitative study / [Kopka M.L., Fratini A.V., Drew H.R., Dickerson R.E.] // J. Mol. Biol. – 1983. – V. 163. – P. 129–146.
- 21. Drew H.R. Structure of a B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration / [Drew H.R., Dickerson R.E.] // J. Mol. Biol. 1981. V. 151. P. 535–556.
- 22. Tereshko V. A "hydration" spine in a B-DNA minor groove / [Tereshko V., Minasov G., Egli M.] // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 3590–3595.
- 23. Zinkel S.S. DNA bend direction by phase sensitive detection / [Zinkel S.S., Crothers D.M.] // Nature. 1987. V. 328. P. 178–181.
- Dickerson R.E. Structure of a B-DNA dodecamer. II. Influence of base sequence on helix structure / [Dickerson R.E., Drew H.R.J.] // Mol. Biol. – 1981. – V. 149. – P. 761–786.
- 25. Rhodes D. Nucleosome cores reconstituted from poly (dA-dT) and the octamer of histones / [Rhodes D.] // Nucleic Acids Res. 1979. V. 6. P. 1805–1816.
- 26. Simpson R.T. Chromatin and core particles formed from the inner histones and synthetic polydeoxyribonucleotides of defined sequence / [Simpson R.T., Kunzler P.] // Nucleic Acids Res. – 1979. – V. 6. – P. 1387–1415.
- 27. Marathe A. Small local variations in B-form DNA lead to a large variety of global geometries which can accommodate most DNA-binding protein motifs / [Marathe A., Karandur D., Bansal M.] // BMC Structural Biology. 2009. V. 9. P. 9-24.
- 28. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / [Зенгер В.] Москва : Мир, 1987. 434 с.
- 29. Arnott S. Refinement of the structure of B-DNA and implications for the analysis of x-ray diffraction data from fibers of biopolymers / [Arnott S., Hukins D.W.] // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. P. 93-105.
- 30. A re-examination of the crystal structure of A-DNA using fiber diffraction data / Chandrasekaran R., Wang M., He R.-G., et al.] // Biomol. Struct. Dyn. – 1986. – V. 6. – P. 1189-1202
- Dickerson R.E. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure components / [Dickerson R.E.] // Nucleic Acids Res. – 1989. – V. 17. – P. 1797-1803.
- 32. Sinden R. R. DNA structure and function (1st ed.) / [Sinden R. R.] // Academic Press. 1994. P. 398.
- Rich A. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA / [Rich A., Norheim A., Wang A.H.J.] // Annual Review Biochemistry. – 1984. – V. 53. – P. 791–846.
- 34. Dickerson R.E. Base sequence and helix structure variation in B and A DNA / [Dickerson R.E.] // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. P. 419-441.
- Bhattacharyya D. Groove width and depth of B-DNA structures depend on local variation in slide / [Bhattacharyya D., Bansal M.] // J. Biomol. Struct. Dyn. 1992. V. 10. P. 213–226.
- Lu X.-J. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures / [Lu X.-J., Shakked Z., Olson W.K.] // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. P. 819-840.
- 37. van Dam L. BI Nucleotides in the B and C forms of natural-sequence polymeric DNA: a new model for the C form of DNA / [van Dam L., Levitt M.H.] // J. Mol. Biol. 2000. – V. 304. – P. 541–561.
- Helix geometry and hydration in an A-DNA tetramer: IC-C-G-G / [Conner B.N., Yun C., Dickerson J.L., Dickerson R.E.] // J. Mol. Biol. – 1984. – V. 174. – P. 663-695.
- Tolstorukov M.Y. Protein–DNA hydrophobic recognition in the minor groove is facilitated by sugar switching / [Tolstorukov M.Y., Jernigan R.L., Zhurkin V.B.] // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 337. – P. 65–76.
- 40. Dickerson R.E. DNA structure from A to B / [Dickerson R.E., Ng Ho-L.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 6986-6988.
- 41. The anatomy of A-, B- and Z-DNA / [Dickerson R.E., Drew H.R., Conner B.N., et al.] // Science. 1982. V. 216. P. 475-485.
- 42. A Standard Reference Frame for the Description of Nucleic Acid Base-pair Geometry / [Olson W. K., Bansal M., Burley S. K., et al.] // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 313. – P. 229-237.
- Bingman C. Crystal and molecular structure of d(GTGCG CAC): investigation of the effects of base sequence on the conformation of octamer duplexes // [Bingman C. Li X., Zon G., Sundaralingam M.] Biochemistry – 1992. – V.31. – P. 12803–12812.
- 44. Gorin A.A. B-DNA Twisting Correlates with Base-pair Morphology / [Gorin A.A., Zhurkin V.B., Olson W.K.] // J. Mol. Biol. 1995. V.247. P.34–48.
- Lu X.-J. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures / [Lu X.-J., Shakked Z., Olson W.K. J.] // Mol. Biol. – 2000. – V.300. – P.819-840.
- Lu X. 3DNA: software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structure / [Lu X., Olson W.K.] // Nucleic Acids Res. – 2003. – V.31. – P.5108-5121.
- 47. Schneider B. Conformations of the Sugar–Phosphate Backbone in Helical DNA Crystal Structures / [Schneider B., Neidle S., Berman H. M.] Biopolymers – 1997. – V.42. – P.113–124.
- 48. Reversible Bending and Helix Geometry in a B-DNA Dodecamer: CGCGAATTBrCGCG* / [Fratini A.V., Kopka M.L., Drew H. R., Dickerson R.E.] // J. Biol. Chem. – 1982. – V.257. – P. 14686-14707.
- α-γ transitions in the B-DNA backbone / [Varnai P., Hartmann B. Djuranovic D., Lavery R.] // Nucleic Acids Res. – 2002. – V.30. – P.5398-5406.

- 50. Molecular dynamics simulations of the 136 unique tetranucleotide sequences of DNA oligonucleotides. II: sequence context effects on the dynamical structures of the 10 unique dinucleotide steps / [Dixit S.B., Beveridge D.L., Case D.A., et al.] // Biophyscal J. 2005. V.89. P.3721-3740.
- 51. The Structure of B-helical C-G-A-T-C-G-A-T-C-G and comparison with C-C-A-A-C-G-T-T-G-G. The effect of base pair reversals / [Grzeskowiak K., Yanagi K., Prive G. G., Dickerson R. E.] J. Biol. Chem. 1991. V.266. P. 8861-8883.
- Sims G. E. Global mapping of nucleic acid conformational space: dinucleoside monophosphate conformations and transition pathways among conformational classes / [Sims G. E., Kim S.-H.] // Nucleic Acids Res. – 2003. – V.31. – P. 5607-5616.
- 53. Intrinsic flexibility of B-DNA: the experimental TRX scale / [Heddi B., Oguey Ch., Lavelle Ch., et al.] // Nucleic Acids Res. 2010. V.38. P.1034–1047.
- Sadasivan C. Space group degeneracy in the packing of a non-selfcomplementary Z-DNA hexamer / [Sadasivan C., Karthe P., Gautham N.] // Acta Cryst. – 1994. – D50. – P.192–196.
- 55. Chatake T. Structural function observed in Z-DNA d(CGCGCG)₂ in the absence of divalent metal cations and polyamines / [Chatake T. J.] // Synchrotron Radiat. 2013. V.20 (Pt 6). P.864-848.
- Rich A. DNA comes in many forms / [Rich A.] // Gene. 1993. V.135. P.99-109.
- 57. Flexibility of the B-DNA backbone: effects of local and neighbouring sequences on pyrimidine-purine steps / [Bertrand H., Ha-Duong T., Fermandjian S., Hartmann B.] // Nucleic Acids Res. – 1998. – V.26. – P.1261-1267.
- Djuranovic D. Conformational Characteristics and Correlations in Crystal Structures of Nucleic Acid Oligonucleotides: Evidence for Sub-states / [Djuranovic D., Hartmann B. J.] Biomol. Struc. Dyn. – 2003. – V.20. – P.771-788.
- 59. Oguey C. Understanding the sequence-dependence of DNA groove dimensions: implications for DNA interactions / [Oguey C., Foloppe N., Hartmann B.] PLoS One. - 2010. -V.5. - e15931
- DNA conformations and their sequence preferences / [Svozil D., Kalina J., Omelka M., Schneider B.] // Nucleic Acids Res. 2008. V.36. P.3690–3706.
- Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics / [Drew H. R., Wing R. M., Takano T., et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – V.78. – P.2179-2183.
- The crystal structure of d(CCCCGGGG): a new A-form variant with an extended backbone conformation / [Haran T.E., Shakked Z., Wang A.H., Rich A. J.] // Biomol. Struct. Dyn. – 1987. – V.2. – P.199-217.
- 63. Molecular structure of the octamer d(G-G-C-C-G-G-C-C): modified A-DNA / [Wang A.H.-J., Fujii S., van Boom J.H., Rich A.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – V.79. – P. 3968–3972.
- 64. Schellman J.A. Flexibility of DNA / [Schellman J.A.] // Biopolymers. 1974. V.13. P.217-226

- Zhurkin V.B. Anisotropic flexibility of DNA and the nucleosomal structure / [Zhurkin V.B., Lysov Y.P., Ivanov V.I.] // Nucleic Acids Res. – 1979. – V.6. – P.1081-1096.
- 66. Ma N. Anisotropy of B-DNA Groove Bending / [Ma N, van der Vaart A.] // J Am Chem Soc. 2016. 138(31) P. 9951-9958.
- Ulyanov N.B. Flexibility of complementary dinucleotide phosphates. A Monte Carlo study / [Ulyanov N.B., Zhurkin V.B.] // Mol Biol (Engl transl). – 1982. – V.16. – P.857-867.
- Sequence-dependent variability of B-DNA: An update on bending and curvature. In: T. Ohyama (ed.) DNA Conformation and Transcription / [Zhurkin V.B., Tolstorukov M.Y., Xu F., et al.] // Springer Science & Business Media. – 2007. – PP. 211
- DNA bending by an adenine-thymine tract and its role in gene regulation / [Hizver J., Rozenberg H., Frolow F., et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V.98. – P.8490–8495.
- The structure of an oligo(dA)·oligo(dT) tract and its biological implications / [Nelson H.C., Finch J.T., Luisi B.F., Klug A.] // Nature. – 1987. – V.330. – P.221– 226.
- 71. Haran T.E. The unique structure of A-tracts and intrinsic DNA bending / [Haran T.E., Mohanty U.] // Q. Rev. Biophys. 2009. V.42 P.41–81.
- 72. Study of DNA binding and bending by Bacillus subtilis GabR, a PLP-dependent transcription factor / [Amidani D, Tramonti A, Canosa AV, et al.] // Biochim Biophys Acta. 2016. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.013
- Zhurkin V.B. Static and statistical bending of DNA evaluated by Monte Carlo simulations / [Zhurkin V.B., Ulyanov N.B., Gorin A.A.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V.88. – P.7046-7050.
- 74. Werner M.H. Intercalation, DNA kinking, and the control of transcription / [Werner M.H., Gronenborn A.M., Clore G.M.] // Science. – 1996. – V.271. – P.778-784.
- A novel roll-and-slide mechanism of DNA folding in chromatin: implications for nucleosome positioning / [Tolstorukov M.Y., Colasanti A.V., McCandlish D.M., et al.] // J. Mol. Biol. – 2007. – V.371. – P.725–738.
- 76. Crothers D.M. DNA bending by adenine-thymine tracts / [Crothers D.M., Shakked Z.] // ed. S. Neidle, London: Oxford Univ. Press. In Oxford Handbook of Nucleic Acid Structures. 1999. P. 455–470.
- 77. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes / [Olson W.K., Gorin A.A., Lu X.J., et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V.95. P.11163-11168.
- 78. El Hassan M.A. Conformational characteristics of DNA: empirical classifications and a hypothesis for the conformational behaviour of dinucleotide steps / [El Hassan M.A., Calladine C.R.] // Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – 1997. – Vol. 355. – No. 1722. – P. 43-100.

- DNA simulation benchmarks as revealed by X-ray structures / [Olson W.K., Colasanti A.V., Li,Y., et al.] // In Sponer J., Lankas F. (eds), Computational studies of RNA and DNA. – 2006. – V.2. – P.235–257.
- Protozanova E. Stacked-unstacked equilibrium at the nick site of DNA. Protozanova E., Yakovchuk P., Frank-Kamenetskii M. D.// J. Mol. Biol. – 2004. – V. 342. – P.775–785.
- Yakovchuk P. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix / [Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M. D.] // Nucleic Acids Res. – 2006. – V.34. – P.564–574.
- Sequence-dependent DNA deformability studied using molecular dynamics simulations / [Fujii S., Kono H., Takenaka S., et al.] // Nucleic Acids Res. 2007. V.35. P.6063–6074.
- Schultz S.C. Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees / [Schultz S.C., Shields G.C., Steitz T.A.] // Science. 1991. V.253. P.1001–1007.
- 84. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution / [Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., et al.] // Nature. 1997. V.389. P.251–260.
- Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition / [Rohs R., West S.M., Liu P., Honig B.] // Current Opinion in Structural Biology. – 2009. – V.19. – P.171-177.
- Matthews B.W. No code for recognition / [Matthews B.W.] // Nature. 1988. V.335. – P.294–295.
- Seeman N.C. Sequence specific recognition of double helical nucleic acids by proteins / [Seeman N.C., Rosenberg J.M., Rich A.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1976. – V.73. – P.804–808.
- 88. von Hippel P.H. Proteine-DNA recognition: new perspectives and underlying themes / [von Hippel P.H.] // Science. 1994. V.263. P.769–770.
- 89. Directional shape complementarity at the proteine-DNA interface / [Yeh C., Chen F., Wang J., et al.] // Mol. Recog. 2003. V.16. P. 213–222.
- Murphy F. Nonsequence-specific DNA recognition: a structural perspective / [Murphy F., Churchill M.] // Structure. – 2000. – V.8. – P. R83–R89.
- Benos P. Towards an understanding of protein-DNA recognition / [Benos P., Lapedes A., Stormo G.] // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 1996. – V.351. – P. 501– 509.
- Oda M. Thermodynamic and kinetic analyses for understanding sequence-specific DNA recognition / [Oda M., Nakamura H.] Genes to Cells. – 2000. – V.5. – P. 319–326.
- 93. Privalov P. L. Thermodynamic problems in structural molecular biology / [Privalov P. L.] Pure Appl. Chem. 2007. V.79 P. 1445–1462.
- 94. Benos P. Is there a code for protein–DNA recognition? / [Benos P., Lapedes A., Stormo G.] // Bioessays. – 2002. – V.24. – P. 466–475.
- Thermodynamic Parameters of Specific and Nonspecific Protein-DNA Binding / [Jen-Jacobson L., Engler L., Ames J., Kurpiewski M., Grigorescu A.] // Supramol. chem. – 2000. – V.12. – P.143–160.

- 96. A thermodynamic study of the Trp repressor–operator interaction / [Ladbury J., Wright J., Sturtevant J., Sigler P.] // J. Mol. Biol. 1994. V.238. P. 669–681.
- 97. Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition / [Rohs R., Jin X., West S.M., et al.] // Annu. Rev. Biochem. 2010. V.79. P.233-269.
- Hydrogen bonds in protein–DNA complexes: Where geometry meets plasticity / [Coulocheria S., Pigisa D., Papavassilioua K.A., Papavassiliou A.G.] // Biochimie. - 2007. – V.89. – P.1291–1303.
- 99. Intermolecular and intramolecular readout mechanisms in protein-DNA recognition / [Gromiha M.M, Siebers J.G., Selvaraj S., et al.] // Mol. Biol. 2004. V.337. P.285-294.
- 100. Sarai A. Protein-DNA recognition patterns and predictions / [Sarai A., Kono H.] // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2005. V.34. P.379-398.
- 101. Indirect recognition in sequence-specific DNA binding by Escherichia coli integration host factor: the role of DNA deformation energy / [Aeling K.A, Opel M.L., Steffen N.R., et al.] // J. Biol. Chem. 2006. V.281. P. 39236-39248.
- 102. Paillard G. Analyzing Protein-DNA recognition mechanisms / [Paillard G., Lavery R.] Structure. 2004. V.12. P.113–122.
- 103. DNA basepair step deformability inferred from molecular dynamics simulations / [Lankas F., Sponer J., Langowski J., Cheatham T.E. 3rd.] // Biophyscal J. 2003. V.85. P. 2872-2883.
- 104. Dickerson R.E. DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality / [Dickerson R.E.] // Nucleic Acids Res. – 1998. – V.26. – P. 1906-19264.
- 105. Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution / [Otwinowski Z., Schevitz R., Zhang R., et al.] // Nature. – 1988. – V.335. – P. 321– 329.
- 106. Classification of Protein-DNA Complexes Based on Structural Descriptors / [Prabakaran P., Siebers J. G., Ahmad S.] // Structure. – 2006. – V.14. – P.1355– 1367.
- 107. Structure and Flexibility Adaptation in Nonspecific and Specific Protein-DNA Complexes / [Kalodimos C. G., Biris N., Bonvin A. M., et al.] // Science. – 2004. – V.305. – P.386-389
- 108. Ferreiro D. Transition state for protein–DNA recognition / [Ferreiro D., Sanchez I., de Prat G.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V.105. P.10797–10802.
- 109. Halford S. An end to 40 years of mistakes in DNA-protein association kinetics? / [Halford S.] // Biochem. Soc. Trans. – 2009. – V.37. – P. 343–348.
- 110. Ahmad S., Sarai A. Moment-based prediction of DNA-binding proteins / [Ahmad S., Sarai A.] // J. Mol. Biol. 2004. V.341. P.65–71.
- 111. Nadassy K. Structural features of protein-nucleic acid recognition sites / [Nadassy K., Wodak S.J., Janin J.] // Biochemistry. 1999. V.38. P. 1999–2017.
- 112. Matthew J. B. Electrostatic Deformation of DNA by a DNA-binding Protein / [Matthew J. B., Ohlendorf D. H.] // J. Biol. Chem. 1985. V.260. P. 5860-5862.

- 113. Protein-nucleic acid recognition: statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure / [Lejeune D., Delsaux N., Charloteaux B., et al.] // Proteins. – 2005. – V.61. – P.258-271.
- 114. Luscombe N.M. Amino acids-base interaction: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level / [Luscombe N.M., Laskowski R.A., Thornton J.M.] // Nucleic Acids Res. – 2001. – V.29. – P. 2860-2874.
- 115. Mandel-Gutfreund Y., Schueler O., Margalit H. Comprehensive analysis of hydrogen bonds in regulatory protein–DNA complexes: in search of common principles / [Mandel-Gutfreund Y., Schueler O., Margalit H.] // J. Mol. Biol. – 1995. – V.253. – P.370–382.
- 116. A role for CH...O interactions in protein-DNA recognition / [Mandel-Gutfreund Y., Margalit H., Jernigan R.L., Zhurkin V.B.] // J. Mol. Biol. – 1998. – V.277. – P.1129-1140.
- 117. Gromiha M.M. Structural analysis of cation-pi interactions in DNA binding proteins / [Gromiha M.M., Santhosh C., Ahmad S.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2004. – V.34. – P. 203–211.
- 118. Reddy C.K. Do water molecules mediate protein-DNA recognition? / [Reddy C.K., Das A., Jayaram B.] // J. Mol. Biol. 2001. V.314. P. 619–632.
- 119. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution / [Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., et al.] J. Mol. Biol. 2002. V.319. P.1097–1113.
- 120. Structural insights into the interaction of the crenarchaeal chromatin protein Cren7 with DNA / [Zhang Z., Gong Y., Guo L., et al.] // Mol. Microbiol. – 2010. – V.76. – P. 749–759.
- 121. Norberg J. Association of protein-DNA recognition complexes: electrostatic and nonelectrostatic effects / [Norberg J.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – V.410. – P. 48–68.
- 122. Jakubec D. Sequence-Specific Recognition of DNA by Proteins: Binding Motifs Discovered Using a Novel Statistical/Computational Analysis / [Jakubec D., Laskowski R.A., Vondrasek J.] // PLoS One. – 2016. – doi: 10.1371/journal.pone.0158704. eCollection 2016.
- 123. Giese K. DNA-binding properties of the HMG-domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1 / [Giese K., Amsterdam A., Grosschedl R.] // Genes Dev. – 1991. – V.5. – P. 2567–2578.
- 124. P22 c2 repressor-operator complex: mechanisms of direct and indirect readout / [Watkins D., Hsiao C., Woods K., et al.] // Biochemistry. - 2008. - V.47. - P. 2325-2338.
- 125. Becker N. Indirect readout: detection of optimized subsequences and calculation of relative binding affinities using different DNA elastic potentials / [Becker N., Wolff L., Everaers R.] // Nucl. Acids Res. – 2006. – V.34. – P. 5638–649.
- 126. How sequence defines structure: a crystallographic map of DNA structure and conformation / [Hays F., Teegarden A., Jones Z., et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V.102. P.7157–7162.

- 127. Vargason J. A crystallographic map of the transition from B-DNA to A-DNA / [Vargason J., Henderson K., Ho P.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V.98. – P. 7265–7270.
- 128. Wu L. Sequence-dependent differences in DNA structure influence the affinity of P22 operator for P22 repressor / [Wu L., Koudelka G.B.] // J. Biol. Chem. – 1993. – V.268. – P. 18975-18981.
- 129. Weston S. X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3Å resolution / [Weston S., Lahm A., Suck D.] // J. Mol. Biol. 1992. V.226. P. 1237–1256.
- 130. Wahl M.C. Crystal structures of A-DNA duplexes / [Wahl M.C., Sundaralingam M.] // Biopolymers. 1997. V.44. P. 45–63.
- 131. Samanta S. Changes in thermodynamic properties of DNA base pairs in protein-DNA recognition / [Samanta S., Chakrabarti J., Bhattacharya D.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2010. – V.27. – P. 429–442.
- 132. Harris L.A. Specific minor groove solvation is a crucial determinant of DNA binding site recognition / [Harris L.A., Williams L.D., Koudelka G.B.] Nucleic Acids Res. – 2014. – V.42. – P. 14053-14059.
- 133. Molecular Dynamics Simulations of the 136 Unique Tetranucleotide Sequences of DNA Oligonucleotides. I. Research Design and Results on d(CpG) Steps / [Beveridge D., Barreiro G., Byun K., Case D., Cheatham T.E.] // Biophys. J. – 2004. – V.87. – P. 3799–3813.
- 134. Indirect readout of the trp-repressor-operator complex by B-DNA backbone conformation transitions / [Wellenzohn B., Flader W., Winger R., et al.] // Biochemistry. 2002. V.41. P. 4088-4095.
- 135. Indirect DNA Sequence Recognition and Its Impact on Nuclease Cleavage Activity / [Lambert A.R., Hallinan J.P., Shen B.W., et al.] // Structure. – 2016. – V.24. – P. 862-873.
- 136. Gorenstein D.G. Conformation and Dynamics of DNA and Protein-DNA Complexes by ³¹P NMR / [Gorenstein D.G.] // Chem. Rev. 1994. V.94. P.1315-1338.
- 137. ³¹P NMR Analysis of the DNA Conformation Induced by Protein Binding SRY/DNA Complexes / [Castagne C., Murphy E., Gronenborn A., Delepierre M.] // Eur. J. Biochem. – 2000. – V.267. – P.1223-1229.
- 138. Hartmann B. BI-BII transitions in B-DNA / [Hartmann B., Piazzola D., Lavery R.] // Nucleic Acids Res. 1993. V.21. P.561-568.
- 139. Fratini A. V. Reversible Bending and Helix Geometry in a B-DNA Dodecamer: CGCGAATTBrCGCG* / [Fratini A. V.] // J. Biol. Chem. – 1982. – V.257. – P.14686-14707.
- 140. Madhumalar A. Sequence preference for BI/BII conformations in DNA: MD and crystal structure data analysis / [Madhumalar A., Bansal M.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2005. – V.23. – P.13-27.
- 141. Djuranovic D. DNA fine structure and dynamics in crystals and in solution: the impact of BI/BII backbone conformations / [Djuranovic D., Hartmann B.] // Biopolymers. – 2004. – V.73. – P.356-368.

- 142. Tisné C. NF-kappa B binding mechanism: a nuclear magnetic resonance and modeling study of a GGG --> CTC mutation / [Tisné C., Hartmann B., Delepierre M.] // Biochemistry. – 1999. – V.38. – P.3883-3894.
- 143. Pearlman D.A. Conformational studies of nucleic acids: III. Empirical multiple correlation functions for nucleic acid torsion angles / [Pearlman D.A., Kim S.H.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1986. – V.4. – P.49-67.
- 144. Haran T.E. The DNA target of the trp repressor / [Haran T.E., Joachimiak A., Sigler P.B.] // The EMBO J. 1992. V.11. P. 3021-3030.
- 145. Manning G.S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides / [Manning G.S.] // Quarterly Reviews of Biophysics. – 1978. – V.11, – P. 179–246.
- 146. Calculating the electrostatic properties of RNA provides new insights into molecular interactions and function / [Chin K., Sharp K.A., Honig. B., & Pyle. A.M.] // Nat Struct Biol. – 1999. – V. 6. – 1055-1061.
- 147. Cherstvy A.G. Electrostatic interactions in biological DNA-related systems / [Cherstvy A.G.] // Physical Chemistry Chemical Physics. 2011. – V.13. – P.9942-9968.
- 148. Jayaram. B. The electrostatic potential of B-DNA / [Jayaram, B., Sharp K. A., Honig B.] // Biopolymers. 1989. V.28. P.975–993.
- 149. The role of DNA shape in protein-DNA recognition / [Rohs R., West S.M., Sosinsky A., et al.] // Nature. 2009. V.461. P.1248-1253.
- 150. Osypov A.A. DEPPDB- DNA electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome DNA / [Osypov A.A., Krutinin G.G., Kamzolova S.G.] // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. 2010. V.08. P.413.
- 151. Weber, I.T. Model of specific complex between catabolite gene activator protein and B-DNA suggested by electrostatic complementarity / [Weber I.T., Steitz T.A.] Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1984. – V. 81. – P. 3973–3977.
- 152. Lavery R. The electrostatic field of DNA: the role of the nucleic acid conformation
 / [Lavery R., Pullman B.] // Nucleic Acids Research, 1982. V.10. P. 4383–4395.
- 153. Electrostatic interactions between arginines and the minor groove in the nucleosome / [West S.M., Rohs R., Mann R.S., Honig B.] // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2010. – V. 27. – P. 861-866.
- 154. Tullius T. Structural biology: DNA binding shapes up / [Tullius T.] // Nature. 2009. V. 461. P. 1225-1226.
- 155. Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure / [Joshi R., Passner J.M., Rohs R., et al.] // Cell. – 2007. – V.131. – P. 530–543.
- 156. Deconvolving the recognition of DNA shape from sequence / [Abe N, Dror I, Yang L, et al.] // Cell. 2015. V. 161. P.307-318.
- 157. Savelyev A. Is DNA's Rigidity Dominated by Electrostatic or Nonelectrostatic Interactions? / [Savelyev A., Materese C.K., Papoian G.A.] // Journal of American Chemical Society. – 2011. – V.133. – P. 19290–19293.

- 158. Harteis S. Making the bend: DNA tertiary structure and protein-DNA interactions / [Harteis S., Schneider S.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – V.15. – P. 12335-12363.
- 159. Absence of a simple code: how transcription factors read the genome / [Slattery M., Zhou T., Yang L., et al.] // Trends in Biochemical Sciences. 2014. V.39. P. 381-399.
- 160. Signatures of protein-DNA recognition in free DNA binding sites / [Locasale J.W., Napoli A.A., Chen S., et al.] // Journal of Molecular Biology. – 2009. – V.386, – P.1054–1065.
- 161. Opposites Attract: Shape and Electrostatic Complementarity in Protein-DNA Complexes / [Harris R.C., Mackoy T., Machado A., et al.] // In: Innovations in Biomolecular Modeling and Simulations. RSC Biomolecular Sciences. – 2012. – V.2. – No.24. – chapter 3.– P.53-80.
- 162. Boschitsch A.H. A fast and robust Poisson-Boltzmann solver based on adaptive Cartesian grids / [Boschitsch A.H., Fenley M.O.] // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2011. – V.7. – P.1524–1540.
- 163. Ahmad S. Sequence-dependence and prediction of nucleotide solvent accessibility in double stranded DNA / [Ahmad S.] // Gene. 2009. V.428. P.25-30.
- 164. The nucleic acid database: A comprehensive relational database of threedimensional structures of nucleic acids / [Berman H. M., Olson W. K., Beveridge D. L., et al.] // Biophysical Journal. – 1992. – V.63. – P.751–759.
- 165. Neidle S. Principles of nucleic acid structure / [Neidle S.] // London:The School of Pharmacy. Elsevier. University of London. 2008. PP.302.
- 166. Berman H.M. The Protein Data Bank: a historical perspective / [Berman H.M.] // Acta Cryst. A. 2008. V.64. P.88-95.
- 167. Higo J. Algorithm for rapid calculation of excluded volume of large molecules / [Higo J., Go N. J.] // Journal of Computational Chemistry. – 1989. – V.10. – P.376–379.
- 168. ProtNA-ASA: Protein-nucleic acid structural database with information on accessible surface area / [Tkachenko M. Y., Boryskina O. P., Shestopalova A.V., Tolstorukov M. Y.] // Int. J. of Quantum Chemistry. – 2010. – V.110. – P.230–232
- 169. DelPhi: a comprehensive suite for DelPhi software and associated resources / [Li L., Li C., Sarkar S., et al.] // BMC, Biophys. 2012. V.4 P.1–9.
- 170. Cornell W.D. A 2nd Generation Force-Field for the Simulation of Proteins, Nucleic-Acids, and Organic-Molecules / [Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 1995. – V.117 – P.5179–5197.
- 171. El Hassan M.A. Two distinct modes of protein-induced bending in DNA / [El Hassan M.A., Calladine C.R.] // J Mol Biol. 1998 V.282 P.331-43.
- 172. Lu X. 3DNA online [*Електронний ресурс*] / [Lu X. Olson's W. K.] // режим доступу до ресурсу: <u>http://w3dna.rutgers.edu/rebuild/fiberch</u> Назва з єкрану.
- 173. Hud N.V. A unified model for the origin of DNA sequence-directed curvature / [Hud N.V., Plavec J.] Biopolymers. 2003. V.69. P.144–159.

- 174. Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex / [Nikolov D.B., Chen H., Halay E.D., et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1996. – V.93. – P.4862-4867.
- 175. Redundant exonuclease involvement in Escherichia coli methyl-directed mismatch repair / [Viswanathan M., Burdett V., Baitinger C., et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V.276. – P.31053–31058.
- 176. Recognition and processing of double-stranded DNA by ExoX, a distributive 3'-5' exonuclease / [Wang T., Sun H.L., Cheng F., et al.] // Nucleic Acids Research. 2013. V.41. P.7556-7565.
- 177. In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair / [Burdett V., Baitinger C., Viswanathan M., et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2001. V.98. P.6765-6770.
- 178. Dermic D. Functions of multiple exonucleases are essential for cell viability, DNA repair and homologous recombination in recD mutants of Eschirichia coli / [Dermic D.] // Genetics. 2006. V.172. P.2057-2069.
- 179. ProtNA-ASA: Protein-nucleic acid structural database with information on accessible surface area / [Tkachenko M. Y., Boryskina O. P., Shestopalova A. V., Tolstorukov M. Y.] // Int. J. Quant. Chem. – 2010. – V.110. – P.230-232.
- 180. DNA Accessible Surface Area and Indirect Protein-DNA Recognition: Study by Bioinformatical Approach: *Proceedings of the 7th EBSA European Biophysics Congress* (Genova (Italy). July 11-15 2009) / [Boryskina O.P., Tkachenko M.Y., Shestopalova A.V., Tolstorukov M.Y.] // Eur Biophys J. – 2009. – V.38 (Suppl 1). – P. S62.
- 181. Zhitnikova M. Yu. Sequence -specific transitions of the torsion angle gamma change the polar-hydrophobic profile of the DNA grooves: implication for indirect protein–DNA recognition / [Zhitnikova M. Y., Boryskina O. P., Shestopalova A. V.] // J. Biomol. Struct. Dyn. –2014. – V.32. – P. 1670-1685.
- 182. An asymmetric complex of restriction endonuclease MspI on its palindromic DNA recognition site / [Xu Q.S., Kucera R.B., Roberts R.J., Guo H.C.] Structure. – 2004. – V.12. – P.1741-1747.
- 183. Structural code for DNA recognition revealed in crystal structures of papillomavirus E2-DNA targets / [Rozenberg H., Rabinovich D., Frolow F., et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1998. – V.95. – P.5194-5199.
- 184. The structure and hydration of the A-DNA fragment d(GGGTACCC) at room temperature and low temperature / [Eisenstein M., Frolow F., Shakked Z., Rabinovich D.] // Nucleic Acids Res. – 1990. – V.18. – P.3185–3194.
- 185. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome / [Li R., Knight J., Bream G., et al.] // Genes Dev. – 1989. – V.3. – P.510–526.
- 186. Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex / [Devarakonda S., Harp J.M., Kim Y., et al.] // EMBO J. – 2003. – V.22. – P.5827-5840

- 187. Sierk M.L. DNA deformability as a recognition feature in the reverb response element / [Sierk M.L., Zhao Q., Rastinejad F.] // Biochemistry. – 2001. – V.40. – P.12833-12843.
- 188. Elrod-Erickson M., Rould M.A., Nekludova L., Pabo C. Zif268 protein–DNA complex refined at 1.6Å: a model system for understanding zinc finger–DNA interactions / [Elrod-Erickson M., Rould M.A., Nekludova L., Pabo C.] // Structure. 1996. V.4. P.1171–1180.
- 189. Moravek Z. Protein and drug interactions in the minor groove of DNA / [Moravek Z., Neidle S., Schneider B.] // Nucleic Acids Res. – 2002. – V.30. – P.1182–1191.
- 190. Parker S.C. DNA Shape, Genetic Codes, and Evolution / [Parker S.C., Tullius T.D.] // Cur. Opin. Struct. Biol. 2011. V.21. P.342–347.
- 191. Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure / [Joshi R., Passner J.M., Rohs R., et al.] // Cell. – 2007. – V.131. – P. 530-543
- 192. Stella S. The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA-bending protein Fis / [Stella S., Cascio D., Johnson R.C.] // Genes & Development. – 2010. – V.24. – P.814-826.
- 193. Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between Hox proteins / [Slattery M., Riley T., Liu P., et al.] // Cell. – 2011. – V.147. – P.1270-1282.
- 194. Olson W.K. Working the kinks out of nucleosomal DNA / [Olson W.K., Zhurkin V.B.] // Current Opinion in Structural Biology. 2011. V.21. P.348-357.
- 195. Richmond T.J. The Structure of DNA in the Nucleosome Core / [Richmond T.J., Davey C.A.] // Nature. 2003. V.423. P.145-150.
- 196. Horton N.C. DNA cleavage by EcoRV endonuclease: two metal ions in three metal ion binding sites / [Horton N.C., Perona J.J.] // Biochemistry. – 2004. – V.43 – P.6841-6857.
- 197. Structural and energetic origins of indirect readout in site-specific DNA cleavage by a restriction endonuclease / [Martin A.M., Sam M.D., Reich N.O., Perona J.J.] // Nat Struct Biol. – 1999. – V.6. – P.269-277.
- 198. DNA intercalation without flipping in the specific ThaI–DNA complex / [Firczuk M., Wojciechowski M., Czapinska H., Bochtler M.] // Nucleic Acids Res. 2011. V.39. P.744-754.
- 199. Structure of PvuII endonuclease with cognate DNA / [Cheng X., Balendiran K., Schildkraut I., Anderson J.E.] // EMBO J. 1994. V.13. P.3927–3935.
- 200. Beato M. Transcription factor access to chromatin / [Beato M., Eisfeld K.] // Nucleic Acids Res. 1997. V.25. P.3559–3563.
- 201. Narlikar L. A. Nucleosome-Guided Map of Transcription Factor Binding Sites in Yeast / [Narlikar L., Gordan R., Hartemink A.J.] // PLoS Computational Biology. – 2007. – V.3. – P.2199-2208.

- 202. Kornberg R.D. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome / [Kornberg R.D., Lorch Y.] // Cell. – 1999. – V.98. – P.285-294.
- 203. Stryer L. Biochemistry (fourth ed.) / [Stryer L.] // New York Basingstoke: W. H. Freeman and Company. 1995.– ISBN 978-0716720096
- 204. Luger K. The histone tails of the nucleosome / [Luger K., Richmond T.J.] Curr. Opin. Genet. Dev. 1998. V.8. P.140–146.
- 205. Luger K. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? / [Luger K., Dechassa M.L. Tremethick D.J.] // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2012. – V.13. – P.436–447.
- 206. Olins A.L. Spheroid chromatin units (v bodies) / [Olins A.L., Olins D.E.] // Science. 1974. V.183. P.330-332.
- 207. Woodcock C.L. Higher order structure of chromatin and chromosomes / [Woodcock C.L., Dimitrov S.] // Curr. Opin. Genet Dev. 2001. V.11. P.130– 135.
- 208. Determinants of histone H4 N-terminal domain function during nucleosomal array oligomerization / [McBryant S.J., Klonoski J., Sorensen T.C., et al.] // Biol. Chem. 2009. V.284. P.16716–16722.
- 209. Structure of nucleosome core particles of chromatin / [Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., et al.] // Nature. 1977. V.269. P.29–36.
- 210. Rando O.J. Genome wide views of chromatin structure / [Rando O.J., Chang H.Y.] // Annu. Rev. Biochem. 2009. V.78. P.245–271.
- 211. Structural Mechanics of DNA Wrapping in the Nucleosome / [Battistini F., Hunter C.A., Gardiner E.J., Packer M.J.] //J. Mol. Biol.– 2010.–V.396.–P.264–279.
- 212. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones / [Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J.] // Methods Enzymol. 1999. V.304. P.3–19.
- 213. X-ray diffraction analysis of crystals containing twofold symmetric nucleosome core particles / [Harp J.M., Uberbacher E.C., Roberson A.E., et al.] // Acta Cryst. – 1996. – D52. – P.283-288.
- 214. Musich P.R. Highly repetitive component alpha and related alphoid DNAs in man and monkeys / [Musich P.R., Brown F.L., Maio J.J.] // Chromosoma. 1980. V.80. P.331-348.
- 215. Richmond T.J. Crystals of a nucleosome core particle containing defined sequence DNA / [Richmond T.J., Searles M.A., Simpson R.T.] // J. Mol. Biol. – 1988. – V.199. – P.161-170.
- 216. Waye J.S. Detection of novel centromeric polymorphisms associated with alpha satellite DNA from human chromosome 11 / [Waye J.S., Greig G.M., Willard H.F.] // Hum Genet. 1987. V.77. P.151-156.
- 217. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly / [Eitoku M., Sato L., Senda T., Horikoshi M.] // Cell Mol. Life Sci. –2008. – V.65. – P.414–444.
- 218. Hewish D.R. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease / [Hewish D.R., Burgoyne L.A.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1973. – V.52. – P.504–510.

- 219. Park Y.J. Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange / [Park Y.J., Luger K.] // Curr. Opin.Struct. Biol. 2008. V.18. P.282–289.
- 220. Polo S.E. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours / [Polo S.E., Almouzni G.] // Curr. Opin. Genet. Dev. 2006 V.16. P.104–111.
- 221. Tan S. Nucleosome structural studies / [Tan S., Davey C.A.] // Curr Opin Struct Biol. 2011. V. 21. P.128–136.
- 222. Rocha W. Clothing up DNA for all seasons: histone chaperones and nucleosome assembly pathways / [Rocha W., Verreault A.] // FEBS Lett. – 2008. – V.582. – P.1938–1949.
- 223. Lusser A. Strategies for the reconstitution of chromatin / [Lusser A., Kadonaga J.T.] // Nat. Methods. 2004. V.1. P.19–26.
- 224. Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA / [Dyer P.N., Edayathumangalam R.S., White C.L., et al.] // Methods Enzymol. – 2004. – V.375. – P.23–44
- 225. Reconstitution of chromatin: assembly of the nucleosome / [Wilhelm F.X., Wilhelm M.L., Erard M., Duane M.P.] // Nucleic Acids Res. – 1978. – V.5. – P.505–521.
- 226. The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone DNA interactions / [Andrews A.J., Chen X., Zevin A., et al.] // Mol. Cell. – 2010. – V.37. – P.834–842.
- 227. Andrews A.J. Nucleosome structure(s) and stability: variations on a theme / [Andrews A.J., Luger K.] Annu. Rev. Biophys. 2011. V.40. P.99-117.
- 228. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface / [Böhm V., Hieb A. R., Andrews A. J., et al.] // Nucleic Acids Res. 2011. V.39. P.3093–3102.
- 229. Polach K.J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation / [Polach K.J., Widom J.] // J. Mol. Biol. – 1995. – V.254. – P.130–149.
- 230. Akey C.W. Histone chaperones and nucleosome assembly / [Akey C.W., Luger K.] // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. V.13. P.6–14
- 231. Widom J. Equilibrium and dynamic nucleosome stability / [Widom J.] // Methods Mol. Biol. 1999. V.119. P.61–77.
- 232. Chromatin remodeling by RNA polymerases / [Studivitsky V.M., Walter W., Kireeva M., et al.] // Trends Biochem Sci. 2004. V.29, P.127-135.
- 233. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle / [Makde R.D., England J.R., Yennawar H.P., Tan S.] // Nature. 2010. V.467. P.562-567.
- 234. McKnight J.N. Sequence-targeted nucleosome sliding in vivo by a hybrid Chd1 chromatin remodeler / [McKnight J.N., Tsukiyama T., Bowman G.D.] // Genome Research 2016. V.26 P. 693–704.
- 235. Crystal Structures of Nucleosome Core Particles in Complex with Minor Groove DNA-binding Ligands / [Suto R.K., Edayathumangalam R.S., White C.L., et al.] // J. Mol. Biol. – 2003. – V.326. – P.371–380.

ДОДАТКИ

Таблиця 1.

0		•					
('THOOM	OTHVETVE	σν 1	DUVONUCTOD	DOMERAN	X 7 1	nnr	10T1
CHRUCK		лп	DHRUDHUIUD	y Dajirica	V	νυι	JU 11
	1, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,		1 .	/	J J		

	118D 137D 138D 160D 1D78 1D79 1DNZ 1M77
	1VJ4 1VT8 1XJX 1Z7I 1ZEX 1ZEY 1ZF1 1ZF6
$\mathbf{D}_{\mathbf{H}}$	1ZF8 1ZFA 212D 213D 243D 260D 295D 2A7E
DIЛЬНА А-DINA (44)	2D94 2HC7 2PKV 2PL4 317D 338D 344D 345D
	348D 349D 368D 369D 370D 371D 395D 396D
	399D 414D 440D 9DNA
	122D 423D 428D 431D 436D 460D 461D 463D
	476D 477D 1D8G 1DOU 1DPN 1EHV 1EN3 1EN8
$\mathbf{D}_{\mathbf{H}\mathbf{H}}$ Here \mathbf{D} $\mathbf{D}\mathbf{N}\mathbf{A}$ (49)	1EN9 1ENE 1ENN 1EI4 1FQ2 1G8U 1G8V 1IKK
DIJIBHA D-DINA (40)	1JGR 1S23 1S2R 1SK5 1ZF0 1ZF5 1ZF7 1ZFB
	1ZFG 1ZFF 2QEG 251D 1BD1 5DNB 1D23 1D49
	1D 56 158D 196D 307D 1BNA 7BNA 9BNA 355D
	1AAY 1AZP 1BF4 1CDW 1CKQ 1D02 1DC1 1DFM
	1DP7 1DSZ 1E3O 1EGW 1ESG 1FIU 1GU4 1H6F
	1JX4 1L1Z 1L3L 1LLM 1LMB 1M5R 1MNN 1MUS
	1NKP 1ORN 1QNA 1QUM 1RH6 1SX5 1TDZ
	1TRO 1WTE 1XYI 1ZS4 2A07 2BOP 2C7P 2E42
Білково-нуклеїнові	2EA0 2FMP 2G1P 2HOS 2IH2 2NQ9 2O4A 2OAA
комплекси (95)	20DI 20FI 2PFN 2R1J 2VBO 2VE9 2VLA 2VOA
	2W42 2W7N 2WBS 2WIW 2XHI 2XO6 3AAF
	3BAM 3BM3 3BS1 3DVO 3E6C 3FDE 3FDQ 3FSI
	3G00 3G9M 3GOX 3HTS 3I0W 3I8D 3IGK 3JXY
	3KDE 3KXT 3L2C 3M4A 3MR3 3NDH 3O1P
	30QG 30SN 3PV8 3PVI 3QMD 3RKQ 3SAU 3SM4
	3SQ1 3V6T

Таблиця 2.

Відсоток нуклеотидів з різними конформаціями кута у для вільної А- і В-ДНК, і ДНК зв'язаної з білками, які отримані з роздільною здатністю кращею, ніж 1.5 Å. База даних містила 15 і 22 структури вільної А- і В-ДНК, і 15 олігонуклеотидів з білково-нуклеїнових комплексів. Загальна кількість нуклеотидів склала 629.

Упаковка	ł	Зільна ДНК	ζ	Зв'язана ДНК				
дезоксирибози	g+ g-		t	<i>g</i> +	g-	t		
А-подібна	87,3	0	12,7	57,4	0	42,6		
В-подібна	100,0	0	0	95,5	1.3	3,2		

Таблиця 3.

Стандартні відхилення значень полярної і гідрофобною ПДП (Å²) в малому і великому желобках для А- і В-подібних нуклеотидів з різними конформаціями кута у для вільної А- і В- ДНК.

		Ц	укроф	осфатн	ний ост	гов				
дезоксирибоза		А-подібна В-подібна								
жолобок	вели	великий малий великий мал						малий		
кут ү нуклеотия	g+	t	g+	t	<i>g</i> +	g-	t	g+	g-	t
	Полярна ПДП, Å ²									
середнє	8,0	6,6	6,1	7,0	6,9	11,9	0,0	6,9	9,8	0,0
А	7,9	5,2	6,3	2,8	6,5	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
С	8,5	2,2	6,4	1,2	8,3	13,8	0,0	7,9	10,4	0,0
G	7,9	7,0	6,3	7,8	6,6	0,0	0,0	7,2	0,0	0,0
Т	4,0	0,0	2,7	0,0	5,3	1,7	0,0	5,0	5,6	0,0
		Ι	Гідроф	обна І	ІДП, Й	Λ^2				
середнє	0,7	2,3	9,4	6,5	5,4	2,3	0,0	7,6	2,5	0,0
А	0,2	0,8	10,5	3,2	3,8	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0
С	0,8	0,7	9,7	3,8	5,6	2,7	0,0	7,1	1,6	0,0
G	0,7	2,6	10,3	6,8	5,8	0,0	0,0	8,4	0,0	0,0
Т	0,2	0,0	2,4	0,0	5,2	1,7	0,0	6,5	3,6	0,0
				Основ	И					
дезоксирибоза		А-по	дібна				В-под	цібна		
жолобок	вели	ікий	мај	тий	В	великий мали			малий	
КУТ ү	g_+	t	g_+	t	g_+	g-	t	g+	g-	t
			Поля	рна ПД	Ц Π, Å ²					
середнє	5,2	5,0	6,3	5,2	6,0	3,0	0,0	5,9	1,7	0,0
Α	4,2	3,2	1,1	0,2	4,3	0,0	0,0	4,3	0,0	0,0
С	4,1	1,4	3,3	0,1	1,6	2,0	0,0	1,6	1,9	0,0
G	5,7	5,4	6,7	4,6	5,2	0,0	0,0	5,2	0,0	0,0
Т	1,6	0,0	1,4	0,0	2,3	2,1	0,0	2,3	2,1	0,0
		I	Гідроф	обна І	ІДП, А	Λ^2				
середнє	9,0	4,2	1,7	1,8	13,4	9,3	0,0	2,2	0,5	0,0
Α	1,9	1,1	1,7	0,4	5,5	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0
С	4,1	0,8	0,4	0,0	6,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0
G	2,9	2,9	1,3	0,6	6,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
Т	3,3	0,0	0,0	0,0	6,8	9,4	0,0	0,1	1,3	0,0

Таблиця 4.

Стандартні відхилення для значень ПДП (Å²) атомів O3', O5' і C5' у нуклеотидів з А- і В-подібними конформаціями дезоксирибози і різними конформаціями кута у у великому і малому желобках для вільної А- і В- ДНК.

дезоксирибоза	А-подібна					В-подібна				
жолобок	вел	пикий		мали	ий	великий		малий		[
кут ү	g_{+}	t	g_+	t	<i>g</i> +	<i>g</i> -	t	<i>g</i> +	<i>g</i> -	t
нуклеотид					8.2					
			03	′ пдп	, A²					
середнє	0,4	0,2	1,3	1,2	0,0	0,0	0,0	2,0	3,2	0,0
А	0,1	0,1	0,8	0,5	0,0	-	-	1,5	-	-
С	0,5	0,0	1,4	0,5	0,0	0,0	-	2,0	2,6	-
G	0,5	0,2	1,4	4,6	0,0	-	-	2,2	-	-
Т	0,2	-	0,7	-	0,0	0,0	0,0	1,7	0,3	0,0
			05	' ПДП	Ų					
середнє	0,4	0,0	0,0	1,2	1,0	2,5	0,0	0,3	0,7	0,0
А	0,1	0,0	0,0	0,6	1,0	-	-	0,1	-	-
С	0,4	0,0	0,0	2,0	1,1	1,6	-	0,2	0,3	-
G	0,5	0,0	0,0	1,3	1,0	-	-	0,5	-	-
Т	0,1	-	0,0	-	0,9	1,6	0,0	0,2	1,0	0,0
			C5	' ПДП,	Ų					
середнє	0,2	2,0	3,6	2,1	0,4	1,2	0,0	3,1	3,2	0,0
А	0,0	0,8	1,4	0,7	0,4	-	-	3,4	-	-
С	0,1	0,5	3,9	4,1	0,6	1,4	-	2,7	3,8	-
G	0,2	2,3	3,9	2,3	0,5	-	-	2,6	-	-
Т	0,0	-	1,7	-	0,2	0,6	0,0	3,0	0,8	0,0

161

Стандартні відхилення значень електростатичного потенціалу (kT/e) і шири	іни
малого жолобка (Å) в залежності від положення нуклеотиду.	

Положення пари основ	±1	±2	±3	±4	±5
Ширина малого жолобка	1,2	1,1	1,4		
Електростатичний потенціал малого жолобка	2,2	1,8	1,9	1,4	0,9

Таблиця 6.

Стандартні відхилення значень електростатичного потенціалу (kT/e) і ширини (Å) малого жолобка для A/T і G/C пар нуклеотидів з різними конформаціями цукрофосфатного остову: конформації кута ү (g+, g-, t) і дезоксирибози (В-подібна (В) і А-подібна (А)). У дужках наведені стандартні відхилення значень ширини малого жолобка (м.ж.) для пар нуклеотидів (A/T або G/C) в певних положеннях щодо центру гексамерів.

		4/T	G/C				
положення	потенціал ширина м.ж.		потенціал	ширина м.ж.			
			-				
±1	1,5	1,5 1,0		1,3			
±2	1,5	0,9	0,6	0,8			
±3	2,2	0,9	1,6	0,9			
		<i>t</i> , B					
±2	1,4	0,2 (0,8)					
		<i>g-</i> , B					
±1			-	- (0,1)			
±2	1,4	0,4 (0,2)					
±3			0,05	0,1 (0,5)			
		g +, A					
±2	0,1	0 (0)	0,8	0 (-)			

162

Стандартні відхилення значень полярної і гідрофобною ПДП (Å²) в малому і великому жолобках для А- і В-подібних нуклеотидів з різними конформаціями кута у для білково-нуклеїнових комплексів.

		Цу	крофо	эсфатн	ний ос	тов					
дезоксирибоза		А-подібна В-подібна									
жолобок	вели	ікий	мај	тий	великий				малий		
κυτ γ	a l	+	a	+	a	a	+	a	a	+	
нуклеотид	87	l	8⊤	l	87	8-	l	8⊤	8-	l	
		Полярна ПДП, Å ²									
середнє	5,2	6,5	5,4	8,1	5,9	3,9	11,4	5,8	4,6	12,4	
А	5,0	5,6	6,0	9,1	5,7	3,7	18,3	5,7	4,1	16,9	
С	3,3	4,4	4,3	5,2	6,3	4,6	7,9	6,2	3,5	8,1	
G	5,7	8,4	5,6	9,7	5,7	3,1	10,4	5,4	5,7	12,6	
Т	5,6	5,3	6,3	6,1	5,7	3,5	5,1	5,9	4,2	4,5	
		Γ	ідроф	обна I	ІДП, І	Å ²					
середнє	1,8	5,9	6,2	7,8	4,6	5,6	10,4	6,1	4,8	10,4	
А	2,5	5,0	7,9	7,6	4,4	4,1	11,1	6,2	3,6	16,9	
С	1,7	4,9	5,1	6,3	5,2	3,9	12,5	5,7	3,5	7,1	
G	1,9	7,1	6,7	8,7	4,5	11,9	8,5	5,8	10,1	9,0	
Т	1,4	4,0	5,4	6,2	4,5	3,8	6,9	5,7	3,0	7,9	
			(Основ	И			-	-		
дезоксирибоза		А-по	дібна				В-под	цібна			
жолобок	вели	кий	мал	тий	В	елики	й	Ν	лалий		
κντ γ											
нуклеотия	<i>g</i> +	t	g_+	t	g_+	g-	t	g_+	g-	t	
			Поля	она ПЛ	ПП. Å	2					
середнє	7.4	8.1	5.1	4.7	5.6	8.6	6.7	5.6	5.7	6.5	
A	7.3	5.5	3.1	1.0	4.7	4.9	4.5	1.8	1.2	1.9	
С	4,4	3.7	3.0	1.9	3.8	2,8	5.7	2,1	1.8	2,7	
G	8.0	8.6	5.9	6.3	4.9	11.8	7.4	5.9	2.7	9.1	
T	5.2	3.5	6.2	2.3	2.6	2.2	2.3	2.8	2.7	3.4	
	с,=	Г	ілроф	,е обна I	<u>_,</u> , ТЛП.	Å ²	_,c	_,0	_,.	0,1	
середнє	12,0	14,6	4.2	2,6	14,7	23,0	13,4	2,9	3.3	3.6	
A	3.9	3.8	4.6	2.3	5.5	3.9	4.5	3.2	1.8	3.2	
С	7.2	4.1	1.5	0.8	6.9	4.4	7.1	0.4	0.0	2.2	
G	4.8	6.5	3.8	2.4	4.8	17.1	3.4	1.6	6.4	4.2	
T	8.8	9.2	1.4	0.0	8.1	6.5	5.1	0.6	0.0	0.0	

163

Стандартні відхилення для значень ПДП (Å ²) атомів ОЗ', О5' і С5' у
нуклеотидів з А- і В-подібними конформаціями дезоксирибози і різними
конформаціями кута ү у великому і малому жолобках.

дезоксирибоза		А-по	дібна		В-подібна					
жолобок	вел	икий	ма	лий	великий			малий		
кут ү										
нуклеотид	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	t	<i>g</i> +	g-	t	<i>g</i> +	<i>g</i> -	t
			03']	ПДП, Й	Λ^2					
середнє	1,3	0,9	1,3	1,1	0,1	0,0	0,1	1,7	1,4	1,6
A	0,8	1,3	1,1	1,5	0,1	0,0	0,1	1,6	1,1	2,3
С	1,8	1,3	1,3	1,3	0,1	0,0	0,2	1,9	2,1	0,9
G	1,7	0,0	1,4	0,6	0,2	0,0	0,0	1,8	1,2	1,3
Т	1,3	0,0	1,2	0,7	0,0	0,0	0,0	1,7	0,7	1,3
			05']	ПДП, Й	$\overline{\Lambda^2}$		·			
середнє	0,9	1,4	0,1	3,2	0,7	1,5	1,6	0,2	1,4	3,2
A	0,4	1,3	0,2	2,7	0,8	1,2	2,0	0,1	1,0	4,0
С	1,1	0,1	0,1	2,2	0,7	1,9	1,6	0,2	1,2	3,1
G	1,1	2,1	0,2	3,0	0,8	0,7	0,9	0,3	1,6	3,1
Т	0,6	0,1	0,1	2,6	0,4	1,0	1,6	0,1	1,3	3,1
			C5']	ПДП, Й	$\overline{\Lambda^2}$					
середнє	0,2	5,3	2,4	2,9	0,2	2,5	8,1	2,7	2,8	4,8
A	0,2	4,6	2,5	3,3	0,2	1,7	10,7	2,9	1,9	7,5
С	0,2	3,5	2,5	2,4	0,3	1,4	7,0	2,3	2,0	2,7
G	0,3	6,7	2,7	2,9	0,2	6,0	7,2	2,8	4,8	3,5
Т	0,1	3,1	1,5	2,2	0,1	1,2	7,2	2,4	1,8	3,0



Рисунок 1. Стереозображення комплексу ендонуклеази EcoRV, зв'язаної зі специфічним сайтом на ДНК (PDB id 1SX5).



Рисунок 2. Стереозображення комплексу рестрикційної ендонуклеази ThaI, зв'язаної зі специфічним сайтом ДНК (PDB id 3NDH).



Рисунок 3. Стереозображення комплексу PvuII, зв'язаного зі специфічним сайтом ДНК (PDB id 3PVI).