

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ЖИТНІКОВА Марія Юріївна



УДК 577.322

КОНФОРМАЦІЇ ЦУКРОФОСФАТНОГО ОСТОВУ ДНК ТА
БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВЕ ВПІЗНАВАННЯ

03.00.02 - біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті радіофізики та електроніки імені О.Я.Усикова НАН України

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Шестопалова Ганна Вікторівна**, Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я.Усикова НАН України, завідувач відділу біологічної фізики.

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Волков Сергій Наумович**, головний науковий співробітник, завідувач лабораторією біофізики макромолекул Інституту теоретичної фізики імені М.М. Боголюбова НАН України.

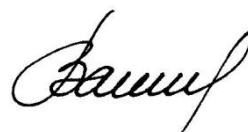
доктор фізико-математичних наук **Трусова Валерія Михайлівна**, доцент кафедри ядерної та медичної фізики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України.

Захист відбудеться " 30 " 03 2017 р. о 15:15 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий " 28 " 02 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Берест В.П.

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 ДНК. Не 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 визначити загальні закономірності 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 і NDB базах даних, проаналізувати спостережувані перебудови цукрофосфатного остову, пов'язані з ними зміни фізичних властивостей ДНК та формування певних типів білково-нуклеїнових 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 впізнання.

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.

1. За допомогою статистичного аналізу кристалографічних структур коротких фрагментів вільної ДНК вперше встановлені закономірності переходів кута γ 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 сиквенс-специфічність перемикачів 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 будь-яку 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. Для ДНК у складі нуклеосом вперше виявлено високий вміст нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ , які можуть розташовуватися або на зовнішній поверхні нуклеосом у сайтах вигину ДНК у жолобки, або рівномірно розподілятися як на зовнішній, так і на внутрішній поверхні ДНК, зверненої до гістонового кору. Такі конформаційні перемикачії кута γ необхідні як для точного позиціонування нуклеосом, що забезпечує їх стабільність, так і для впізнання білками конкретних сайтів зв'язування на ДНК.

Практичне значення отриманих результатів.

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, кількість білково-нуклеїнових контактів. Статистика відвідувань бази даних в Інтернеті: 3392 загальних звертань (612 унікальних ір 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 [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”, Kyiv (Ukraine), 2008; VIII-th і 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 Пушинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI Века”, Пушино (Россия), 2009; 4th ESF Conference on Functional Genomics & Disease, Dresden (Germany), 2010; V з’їзд Українського біофізичного

товариства, Луцьк (Україна), 2011; II, III, IV International Conferences “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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми роботи, сформульовано мету і задачі дослідження, показано зв'язок роботи з науковими програмами та темами, визначено наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, наведено відомості про апробацію результатів та зазначено особистий внесок здобувача.

У **розділі 1** представлено огляд літератури за темою дисертації. Наведено загальну характеристику нуклеїнових кислот, зокрема ДНК, відомості про поліморфізм та структурні критерії різноманітних форм ДНК. Дано загальну характеристику конформаційних змін подвійної спіралі ДНК. Особливу увагу приділено білково-нуклеїновим комплексам. Наведено загальні уявлення про специфічність білково-нуклеїнових комплексів і механізми білково-нуклеїнового впізнавання. Викладено теоретичні засади конформаційних перебудов цукрофосфатного остову фрагментів вільної ДНК та ДНК в комплексах з білками і їх сиквенс-специфічності. Проведено аналіз робіт, присвячених впливу конформаційних перебудов подвійної спіралі ДНК на полярність і електростатичний потенціал малого жолобку.

У **розділі 2** надано опис основних методик та об'єктів досліджень. Описана створена база даних, використана для досліджень за темою роботи, котра містить 44 і 54 структури вільної А- та В-ДНК, відповідно, та 128 структур білково-нуклеїнових комплексів. Обґрунтовано вибір структур фрагментів вільної ДНК та білково-нуклеїнових комплексів, отриманих методом рентгеноструктурного аналізу (РСА) з роздільною здатністю вищою, ніж 1,9 Å, яка дозволяє точно визначити конформацію дезоксирибози та торсійні кути остова ДНК і проводити статистичний аналіз їх розподілу. Всі олігонуклеотиди мають немодифіковану подвійну спіраль і містять більше чотирьох нуклеотидів у кожному ланцюзі. Набір структур білково-нуклеїнових комплексів, використаних для аналізу, є негомологічним, тобто з групи комплексів з однаковим білком вибиралася одна структура, отримана з найкращою роздільною здатністю.

Для аналізу нуклеосом була створена база даних, що містить 16 структур нуклеосом, отриманих з роздільною здатністю вищою, ніж 2,6 Å. Ці структури містять гістонові білки шпорцевої жаби, дрізофіли, людини і курчати (*Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*) і паліндромні фрагменти ДНК довжиною 146 або 147 пар основ, побудовані на підставі послідовності альфа-сателітної ДНК людини.

Значення торсійних кутів α (O3'–P–O5'–C5') і γ (O5'–C5'–C4'–C3') цукрофосфатного остову ДНК і фазового кута псевдообертання (P) цукрового кільця для кожного нуклеотиду розраховувалися за допомогою пакету програм 3DNA/CompDNA. Значення торсійних кутів α і γ класифікувалися як ***g*⁺**, ***t*** і ***g*[–]** відповідно трьом відомим класичним загальмованим конформаціям: ***g*⁺** (60° ± 30°), ***t*** (180° ± 30°), ***g*[–]** (300° ± 30°). При цьому для кута α канонічною вважається ***g*[–]** конформація, а для кута γ – ***g*⁺**. Дезоксирибози були розділені на дві категорії: В-подібні (“South”, 120° < P < 220°) і А-подібні (“North”, -60° < P < 60°).

Ширина малого жолобка для динуклеотидного кроку *k* розраховувалася на підставі алгоритму El Hassan і Calladine як середнє значення двох виділених міжфосфатних відстаней за формулою (1):

$$\frac{1}{2}((P_{k-2} - P_{k+1}) + (P_{k-1} - P_{k+2})) \quad (1)$$

У розділі 2 також описана методика визначення кількості білково-нуклеїнових контактів. Два атома білка і ДНК вважалися взаємодіючими, якщо відстань між їх центрами була менша ніж 4,5 Å. Таким чином ми знаходимо атоми, які взаємодіють за всіма механізмами (водневі зв'язки, електростатичні взаємодії і ван-дер-ваальсові взаємодії) у великому і малому жолобках, без визначення точного типу взаємодії для кожної пари атомів, яка утворює контакти.

Площа доступної поверхні (ПДП) атомів розраховувалась за модифікованим алгоритмом Ніго та Го. Молекула містилася у віртуальний осередок, простір всередині якої ділився на куби зі стороною *a* таким чином, що найменший куб мав сторону 1,5625·10⁻² Å. Для кожного куба визначається його положення відносно поверхні макромолекули (зовні, всередині або на поверхні).

Електростатичний потенціал малого жолобка олігонуклеотидів вільної ДНК розраховувався за допомогою програмного пакету DelPhi, який базується на вирішенні нелінійного рівняння Пуасона-Больцмана. Всі обчислення проводилися при 0,145 М Na⁺, внутрішній молекулярній діелектричній постійній $\epsilon = 2$ і діелектричній проникності навколишньої води $\epsilon = 80$.

Електростатичний потенціал розраховувався в контрольній точці, розташованій поблизу “дна” малого жолобка приблизно в площині пари основ ***i***. Контрольна точка ***i*** визначалася як геометричний центр між атомами O4' нуклеотидів ***i*** + 1 першого ланцюга ДНК в напрямку 5'-3' і нуклеотидів ***i*** - 1 другого ланцюга в напрямку 3'-5'. Дана методика дозволяє розрахувати електростатичний потенціал малого жолобка в центрі пари основ з точністю до 10%.

Для проведення аналізу впливу конформації торсійного кута γ на електростатичний потенціал малого жолобка фрагменти вільної В-ДНК були розділені на групи за нуклеотидним складом їх центрального динуклеотидного кроку. У відібраних нами 70 структурах вільної В-ДНК присутні послідовності з шістьма унікальними центральними димерами: CG, TA, TG, GA, GC и AT. З них

групи з TG і GA центральними кроками представлені тільки однією послідовністю. Всі пари основ були пронумеровані в обох напрямках, починаючи з центрального положення ± 1 і наступними ± 2 , ± 3 і т. д. Пара нуклеотидів розглядалася як така, що має альтернативні конформації, якщо хоча б один з нуклеотидів у будь-якому комплементарному ланцюзі мав альтернативну конформацію кута γ . Комплементарна пара динуклеотидів вважалася такою, що має альтернативну конформацію кута γ , якщо другий нуклеотид з 5'-кінця будь-якого ланцюга ДНК мав альтернативну конформацію кута γ .

У **третьому розділі** наведені результати вивчення структурних особливостей цукрофосфатного остову коротких фрагментів вільної ДНК, отриманих методом РСА, і розрахунку їх електростатичного потенціалу.

При дослідженнях було виявлено, що вільна А-ДНК має вищий відсоток нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ , але спостерігаються перемикання тільки в *t* конформацію, тоді як переходи в альтернативну *g*-конформацію кута γ для А-ДНК не виявлені (таблиця 1). При цьому максимальну схильність до конформаційних переходів кута γ в альтернативну *t* конформацію у А-ДНК мають нуклеотиди, що містять аденін.

Таблиця 1

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

Форма	А-ДНК		В-ДНК		
кут γ	<i>g</i> ⁺	<i>t</i>	<i>g</i> ⁺	<i>g</i> ⁻	<i>t</i>
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
Г	76,7	23,3	100,0	0,0	0,0
Т	100,0	0,0	97,6	1,6	0,8

Для вільної В-ДНК переходів у альтернативні конформації кута γ 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 (на рівні упаковки дезоксирибози), і по відношенню до послідовності (типу нуклеотиду), що може бути пояснено різною здатністю до деформації окремих нуклеотидів.

Крім того було показано, що переходи кута γ в альтернативні конформації викликають суттєву зміну полярності жолобків, змінюючи їх на протилежну. З рисунку 1 видно, що нуклеотиди з класичною *g*⁺ конформацією кута γ і обома упаковками дезоксирибози мають співвідношення полярної/гідрофобної ПДП більше 1 у великому жолобку і менше 1 в малому жолобку. У малому жолобку перехід кута γ в альтернативні *t* і *g*⁻ конформації призводить до збільшення співвідношення полярної/гідрофобної ПДП до значень більше 1 завдяки одночасному збільшенню значень ПДП полярних і зменшенню ПДП гідрофобних атомів цукрофосфатного остову ДНК.

У середньому, це співвідношення збільшується в 2,4 рази у нуклеотидів з альтернативною ***g***- конформацією кута γ у В-ДНК і в 2 рази у нуклеотидів з альтернативною ***t*** конформацією кута γ і будь-якою упаковкою дезоксирибози (і А-, і В-подібною). У великому жолобку перехід ***g***⁺ $\rightarrow$ ***t*** кута γ викликає протилежний ефект: одночасні зміни абсолютних значень полярної і гідрофобної ПДП цукрофосфатного остову ДНК призводять до зменшення співвідношення полярної/гідрофобної поверхонь в 1,8 і 2 рази для В-ДНК і А-ДНК, відповідно. Такі зміни властивостей жолобків, як і конформаційні перебудови кута γ , сиквенс-специфічні.

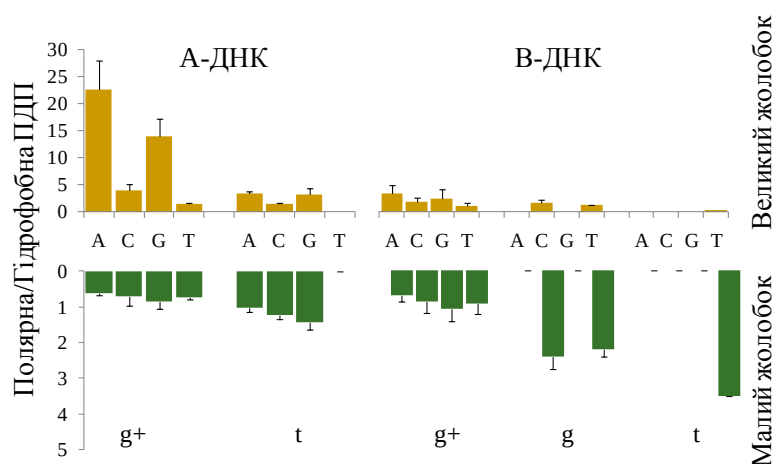


Рисунок 1. Співвідношення полярної/гідрофобної ПДП нуклеотидів у жолобках вільної А- і В-ДНК. Планки похибок відображають стандартне відхилення.

При дослідженнях було виявлено, що перехід кута γ в альтернативну ***t*** конформацію викликає звуження малого жолобка і, як наслідок, збільшення його електронегативності (таблиця 2).

Таблиця 2

Середні значення електростатичного потенціалу (кТ/е) і ширини (Å) малого жолобка (м.ж.) для А/Т и G/С пар нуклеотидів з різними конформаціями цукрофосфатного остову: конформації кута γ (***g***⁺, ***g***⁻, ***t***) та дезоксирибози (В-подібна (В) і А-подібна (А))

положення	А/Т		G/С	
	потенціал	ширина м.ж.	потенціал	ширина м.ж.
<i>g</i> ⁺ , В				
±1	-9,4 ±1,5	10,4±1,0	-5,5±1,2	11,2±1,3
±2	-8,4 ±1,5	10,3±0,9	-5,4±0,6	11,7±0,8
±3	-6,8±2,2	11,2±0,9	-5,8±1,6	12,7±0,9
<i>t</i> , В				
±2	-10,0±1,4	9,3±0,2	-	-
<i>g</i> ⁻ , В				
±1			-5,1±0,0	11,9±0,1
±2	-6,6±1,4	12,3±		
±3			-4,8±0,1	14,4±0,1
<i>g</i> ⁺ , А				
±2	-8,5±0,1	9,6±0,0	-5,5±0,8	11,2±0,0

Навпаки, перехід в альтернативну *g*- конформацію призводить до зменшення електронегативності малого жолобка і для А/Т, і для G/C пар нуклеотидів, що пояснюється розширенням малого жолобка в місцях локалізації “альтернативних” нуклеотидів. Перехід дезоксирибози з В-подібної до А-подібної упаковки не призводить до суттєвих змін електростатичного потенціалу малого жолобка.

Для більш детального дослідження сиквенс-специфічності розподілу електростатичного потенціалу в малому жолобку були побудовані залежності величини потенціалу від положення пари нуклеотидів у ланцюзі щодо центру фрагмента ДНК (рисунк 2) для чотирьох груп гексамерів.

Аналіз розподілу електростатичного потенціалу гексамерів з центральним CG кроком вказує на схожість форми електростатичного потенціалу, яка не залежить від послідовності фланкуючих нуклеотидів (рис. 2а). Винятком є послідовність d(ATCGAT)₂ з найбільш жорсткими фланкуючими АТ кроками, які призводять до звуження малого жолобка і, як наслідок, до збільшення електронегативного потенціалу малого жолобка.

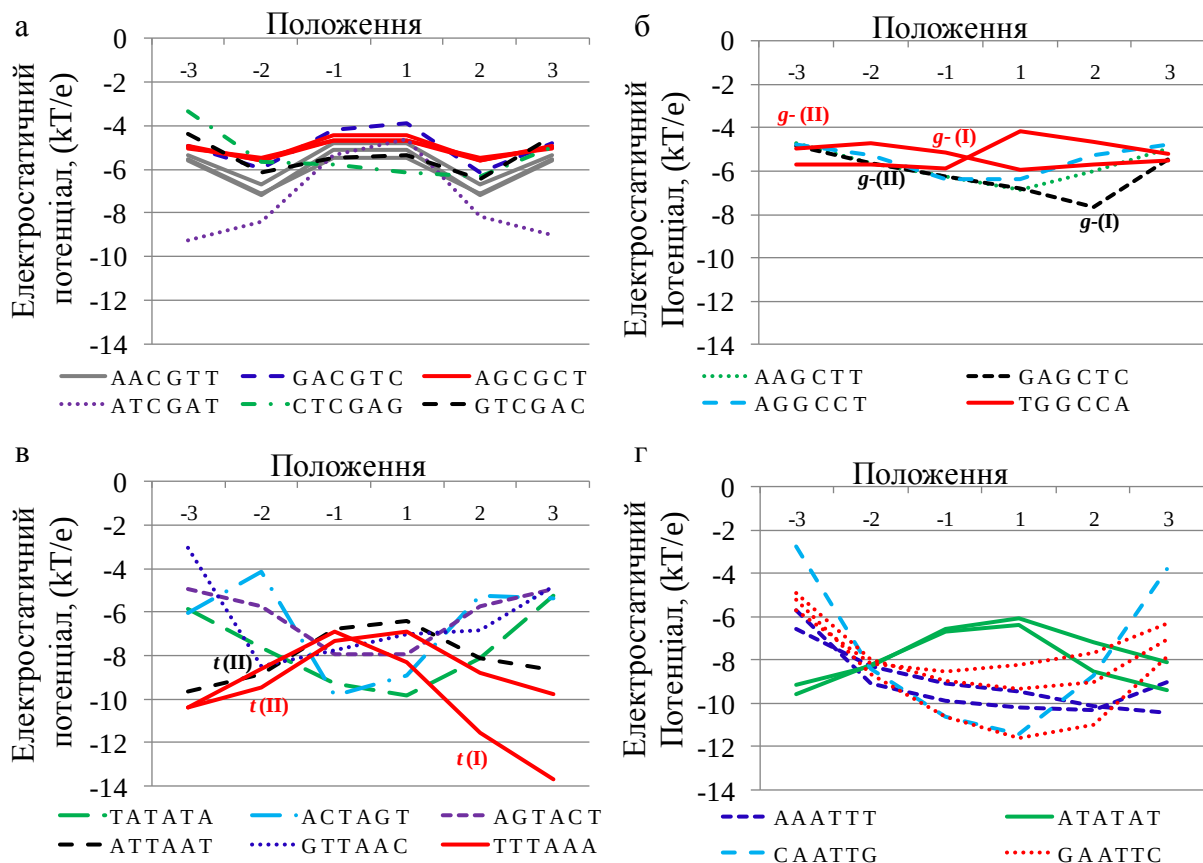


Рисунок 2. Залежність електростатичного потенціалу від положення нуклеотиду для послідовностей з центральними CG, GC, TA і АТ кроками (а, б, в і г, відповідно), положення -1, 1 визначає дві центральні комплементарні пари нуклеотидів; позначені положення нуклеотидів з альтернативними *g*- і *t* конформаціями кута γ ; в дужках наведено ланцюг, який містить перемкнутий нуклеотид.

Електростатичний профіль малого жолобка у послідовностей з жорстким центральним GC кроком розрізняється незначно, але в більшій мірі, ніж для

послідовностей з центральним CG кроком (рисунок 2б). Мінімальну схожість форми розподілу значень електростатичного потенціалу малого жолобка в цій групі мають гексамери $d(\text{GAGCTC})_2$ і $d(\text{TGGCCA})_2$, що містять нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ . Пари нуклеотидів з альтернативною ***g***-конформацією кута γ мають більш негативний електростатичний потенціал малого жолобка, що можна пояснити зміною площі доступної поверхні (ПДП) полярних атомів цукрофосфатного остову ДНК: при переході В-подібних нуклеотидів з класичної ***g***⁺ в альтернативну ***g***- конформацію кута γ ПДП полярних атомів малого жолобка вільної ДНК збільшується на 16 Å² при одночасному зменшенні гідрофобної ПДП на 20 Å².

Розподіл електростатичного потенціалу малого жолобка у фрагментів з центральним ТА кроком істотно залежить від нуклеотидного складу фланкуючих нуклеотидів (рисунок 2в) і конформації кута γ : його перемикання в альтернативну ***t*** конформацію для пар нуклеотидів у гексамерів $d(\text{ATTAAT})_2$ і $d(\text{TTTAAA})_2$ призводить до істотно різних форм розподілу потенціалу. Причиною такої зміни для гексамеру $d(\text{TTTAAA})_2$ є зменшення ширини малого жолобка в сайті локалізації “альтернативних” нуклеотидів (положення 2).

Електростатичні потенціали гексамерів з найбільш жорстким центральним $d(\text{xAAATTx})_2$ тетрамером мають близьку за формою залежність розподілу потенціалу малого жолобка (рисунок 2г), але розрізняються за його абсолютним значенням. Збільшення електронегативності малого жолобка в центрі таких гексамерів узгоджується зі спостережуваним у А-трактів звуженням малого жолобка. Гексамери з центральним ТАТА тетрануклеотидом відрізняються електростатичним профілем малого жолобка в порівнянні з іншими гексамерами цієї групи, оскільки ТАТА послідовності мають тенденцію до розширення малого жолобка і таким чином зменшують абсолютне значення електростатичного потенціалу.

Тобто перебудови кута γ впливають на значення і форму розподілу електростатичного потенціалу малого жолобка коротких фрагментів вільної ДНК, який, в свою чергу, залежить від розмірів малого жолобка, площі доступної поверхні атомів цукрофосфатного остову і послідовності (є сиквенс-специфічним).

У **четвертому розділі** “Конформаційна варіабельність цукрофосфатного остову коротких фрагментів ДНК в комплексах з білками” наведені результати аналізу конформаційних перебудов кута γ цукрофосфатного остову ДНК для кристалографічних структур білково-нуклеїнових комплексів.

Основна кількість нуклеотидів 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, особливо для А-подібних нуклеотидів: ~ 32% нуклеотидів з А-подібною конформацією дезоксирибози у комплексах з білками має альтернативний стан цукрофосфатного остову (таблиця 3). Необхідно також відзначити, що А-подібні нуклеотиди з альтернативною ***t*** конформацією кута γ , як і у вільній ДНК, утворюють “кластери”.

Ці результати дозволяють припустити, що одночасний перехід дезоксирибози в А-конформацію і кута γ в t конформацію може полегшувати утворення комплексів з певними класами білків.

Альтернативні ***g***- конформації для нуклеотидів з А-подібною упаковкою дезоксирибози не виявлені, очевидно, існують деякі стеричні обмеження для реалізації цієї конформації у А-подібних нуклеотидів.

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.

Таблица 3

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

Конформація дезоксирибози	А-подібна			В-подібна		
кут γ	g^+	g^-	t	g^+	g^-	t
нуклеотид						
середнє	67,2	-	32,8	93,4	3,9	2,7
A	66,7	-	33,3	95,6	2,2	2,2
C	75,6	-	24,4	90,1	6,0	3,9
G	47,1	-	52,9	96,0	1,9	2,1
T	79,6	-	20,4	92,0	5,4	2,7

При аналізі співвідношення полярної/гідрофобної ПДП зв'язаної ДНК було виявлено, що це співвідношення має ті ж закономірності що і для вільної ДНК, але значення ПДП розрізняються за абсолютними значеннями (рисунк 1, рисунок 3).

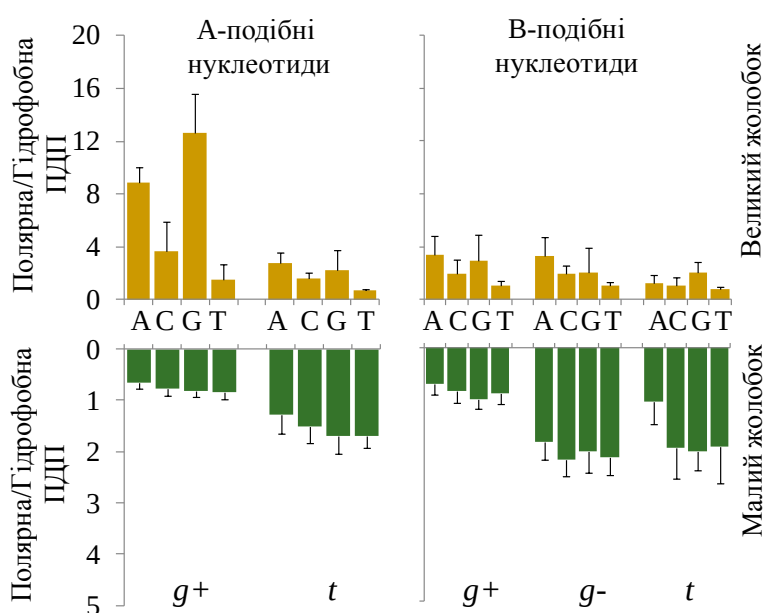


Рисунок 3. Співвідношення полярної/гідрофобної ПДП нуклеотидів у жолобках А- і В-ДНК в комплексах з білками. Планки похибок відображають стандартне відхилення.

Тому можна припустити, що спостережувана зміна полярного профілю жолобків при перемиканні кута γ і/або переході дезоксирибози з С2'-ендо- в С3'-ендо форму може розглядатися як один зі способів реалізації механізму непрямого впізнавання на ранніх стадіях білково-нуклеїнового комплексоутворення.

Аналіз білково-нуклеїнових взаємодій показав, що А-подібні нуклеотиди в класичній g^+ конформації кута γ взаємодіють з білками більш активно в малому жолобку, в той час як В-подібні нуклеотиди частіше беруть участь у білково-нуклеїнових контактах у великому жолобку (рисунок 4). Крім того, в обох жолобках А-подібні нуклеотиди перевищують В-подібні за загальною кількістю контактів у обох жолобках. Єдиним винятком є нуклеотиди, які містять цитозин з t конформацією кута γ , що формують контакти в малому жолобку і мають число контактів вище у нуклеотидів з В-подібною конформацією дезоксирибози.

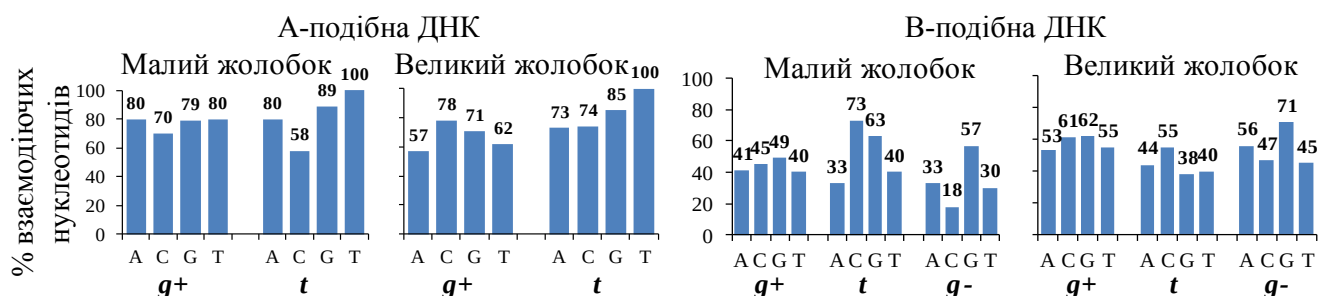


Рисунок 4. Відсоток нуклеотидів, що взаємодіють з білками в жолобках ДНК.

Крім того, здатність нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ взаємодіяти з білками є сиквенс-специфічною. Для А-подібних нуклеотидів виявлено збільшення числа таких контактів у обох жолобках у всіх нуклеотидів з альтернативною t конформацією кута γ , крім нуклеотидів, які містять цитозин. Важливо відзначити, що 100% А-подібних нуклеотидів, що містять тимін з альтернативною t конформацією кута γ з досліджуваної вибірки структур, взаємодіють з білками в обох жолобках. Аналіз В-подібних нуклеотидів показав, що в малому жолобку нуклеотиди з t конформацією кута γ , які містять гуанін і цитозин, мають найбільшу схильність до утворення білково-нуклеїнових контактів, а В-подібна g^- конформація кута γ вигідна для утворення контактів у обох жолобках тільки для нуклеотидів, що містять гуанін.

Також була розглянута можливість кореляції між конформацією нуклеотидів і ПДП двох полярних О3', О5' і одного гідрофобного С5' атомів цукрофосфатного остову, які найбільш часто утворюють білково-нуклеїнові контакти в комплексах. Було виявлено (рисунок 5) зміни ПДП полярних О3', О5' і неполярного С5' атомів у результаті перебудов цукрофосфатного остову ДНК у комплексах з білками: у нуклеотидів з обома альтернативними конформаціями кута γ доступність О3' і О5' атомів у малому жолобку збільшується, а ПДП С5' атома зменшується, але атом С5' стає більш доступним у великому жолобку.

Зафіксовані зміни ПДП розглянутих атомів цукрофосфатного остову є сиквенс-специфічними. ПДП О3' атому в малому жолобку вище у нуклеотидів,

які містять гуанін і мають **t** конформацію кута γ незалежно від упаковки дезоксирибози. Найбільші значення ПДП О5' атома спостерігаються у А-подібних нуклеотидів, які містять цитозин та мають **t** конформацію кута γ . В-подібні нуклеотиди, що містять гуанін і мають **g**- конформацією кута γ , характеризуються найбільшими значеннями ПДП С5' атома в обох жолобках.

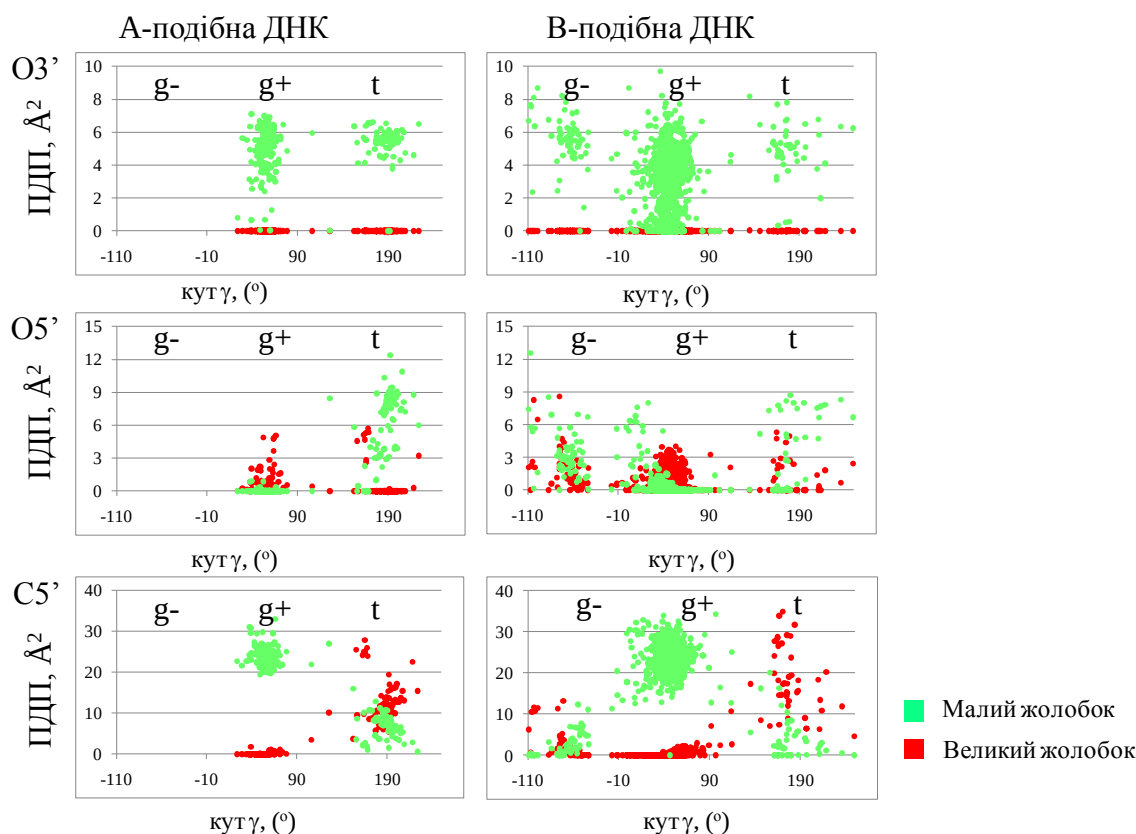


Рисунок 5. Значення ПДП ($\text{\AA}^2$) атомів О3', О5' і С5' у нуклеотидів з А- і В-подібними конформаціями дезоксирибози і різними конформаціями кута γ у великому і малому жолобках.

Як описані вище зміни цукрофосфатного остову ДНК можуть бути використані при реалізації механізмів білково-нуклеїнового впізнавання?

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, О3', О5' і С5' атомів. Важливість цього факту пов'язана з тим, що такі зміни ПДП можуть впливати на участь атомів О3', О5' і С5' у неспецифічних білково-нуклеїнових контактах. Аналізуючи білково-нуклеїнові взаємодії, було отримано підтвердження того, що крім високої здатності до утворення контактів у малому жолобку в нуклеотидів з А-подібною упаковкою дезоксирибози, А-подібні нуклеотиди з **t** конформацією кута γ частіше взаємодіють з білками в обох жолобках, ніж А-подібні нуклеотиди з класичною конформацією кута γ . Ця тенденція найбільш виражена у нуклеотидів, що містять тимін. Нуклеотиди з В-подібною упаковкою дезоксирибози і **t** конформацією кута γ також частіше утворюють контакти в обох жолобках (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. Тобто, зміна полярно-неполярного профілю жолобків, що спостерігається при перемиканні кута γ і/або $B \rightarrow A$ переході дезоксирибози може розглядатися як один з способів реалізації механізму непрямого білково-нуклеїнового впізнання.

У п'ятому розділі наведені результати обчислення і подальшого 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.

На першому етапі дослідження була визначена кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кутів α і γ . Відсоток нуклеотидів з класичної ***g+*** і альтернативними ***t*** або ***g-*** конформаціями кута γ для нуклеосомної ДНК 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 перебудованим кутом γ для нуклеосомної ДНК вище, ніж в білково-нуклеїнових комплексах (див. таблицю 3).

Було показано, що для конформаційних переходів кутів α і γ спостерігається сиквенс-специфічність. Існують наступні найпоширеніші комбінації кутів α/γ : ***g+/g-*** для нуклеотидів, що містять тимін; ***t/t*** - для нуклеотидів, що містять цитозин; ***t/g+*** - для нуклеотидів, що містять аденін; ***g+/t*** - для нуклеотидів, що містять аденін і гуанін (таблиця 4).

Таблиця 4

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

	Всі нуклеотиди	А	С	G	Т
	% від загального числа нуклеотидів	% від числа нуклеотидів в кожній конформації			
Конформації кута γ :					
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 α :					
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
Комбінації конформацій кутів α/γ :					
$g-/g^+$	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
t/g^+	0,6	71,4	4,8	0,0	23,8
g^+/t	0,7	40,0	12,0	36,0	12,0

На наступному етапі дослідження було проведено порівняння розташування нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ на поверхні суперспіралі нуклеосомної ДНК. Нами встановлено, що розташування нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ у всіх розглянутих 16 нуклеосом різняться і утворюють дві основних групи. У першій групі нуклеотиди з альтернативними конформаціями кута γ ($78 \pm 22\%$ нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ) переважно розташовуються на зовнішній поверхні нуклеосом. Другий тип включає структури з рівномірним розподілом таких нуклеотидів на внутрішній і зовнішній поверхні нуклеосом. На зовнішній поверхні суперспіралі ДНК знаходиться $51 \pm 1\%$ нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ , $49 \pm 1\%$ таких нуклеотидів розташовані на внутрішній поверхні, поверненою до гістонового кору нуклеосомі.

Також визначено загальну кількість нуклеотидів з альтернативними конформаціями пари кутів γ/α в кожній позиції обох комплементарних ланцюгів нуклеосомної ДНК для всіх досліджуваних структур нуклеосом (рисунок 6).

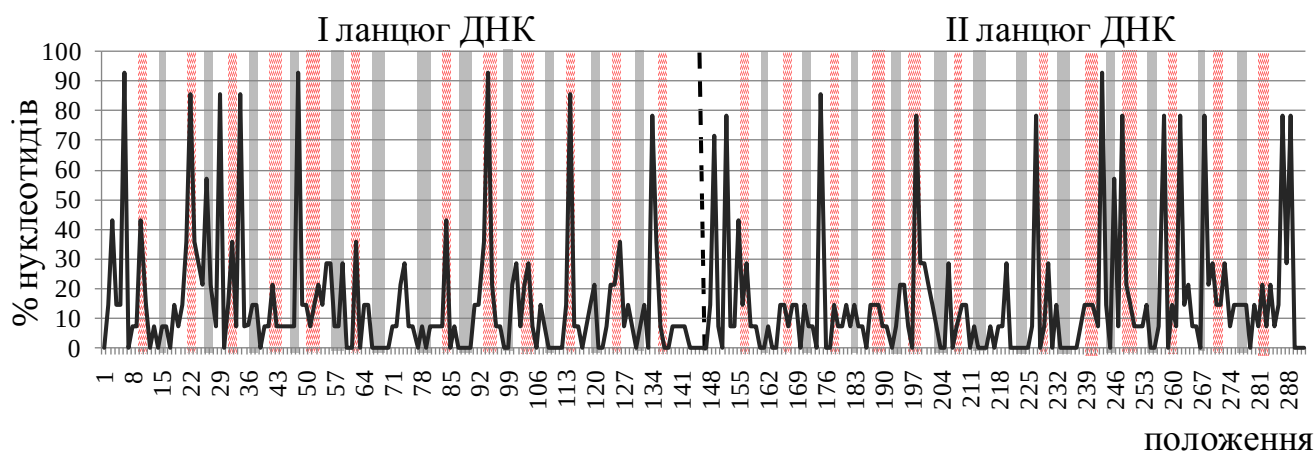


Рисунок 6. Число нуклеосом з альтернативними конформаціями кута γ в певній позиції кожного з двох комплементарних ланцюгів ДНК. Вигини ДНК у великий і малий жолобок виділені штриховкою і сірим кольором, відповідно.

Було отримано, що більшість нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ розташовані в сайтах вигину ДНК у жолобки або біля них. Для нуклеотидів з некласичними конформаціями кута α не зафіксовано будь-яких особливостей їх розташування вздовж нуклеосомної ДНК (рис.6). Аналіз залежності розподілу нуклеотидів нуклеосомної ДНК від конформації кута γ виявив також існування двадцяти “консервативних” положень нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ .

Для з’ясування ролі зафіксованих нами перебудов нуклеосомної ДНК у формуванні структури нуклеосомі ми розглянули можливість існування кореляції між локальними параметрами Roll, Twist і Slide нуклеосомної ДНК і конформацією кута γ у певних положеннях альтернативних нуклеотидів. Ми також оцінили імовірність утворювання контактів між нуклеосомною ДНК і гістоновим кором у залежності від положення альтернативних нуклеотидів. Нами було встановлено взаємозв’язок між деформацією нуклеосомної ДНК та наявністю в певних

положеннях нуклеотидів з неklasичною конформацією торсійного кута γ . Тобто у нуклеосомної ДНК нуклеотиди з альтернативними конформаціями можуть сприяти деформації подвійної спіралі для формування лівої суперспіралі на гістоновому корі та утворюванню контактів між нуклеосомною ДНК і гістонами. Одночасно значна частина нуклеотидів з альтернативними конформаціями кута γ розташовується на поверхні нуклеосом, тому можна припустити, що альтернативні нуклеотиди сприяють взаємодії не тільки з гістоновим кором, але і з іншими білками на вільних ділянках нуклеосомної ДНК за механізмом непрямого впізнавання.

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 сиквенс-специфічність, 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 сиквенс-специфічність 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 А-подібних 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 площі доступної поверхні атомів цукрофосфатного остову, зокрема, атомів O3', O5' і C5'. 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.

Перелік опублікованих праць за темою дисертації.

1. Tkachenko M.Yu. ProtNA-ASA: Protein-Nucleic Acid Structural Database with Information on Accessible Surface Area / **M.Yu. Tkachenko**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova, M.Y. Tolstorukov // International Journal of Quantum Chemistry. – 2010. – V. 110, P. 230 – 232.
2. Boryskina O. P. Variability of DNA structure and protein-nucleic acid recognition / O. P. Boryskina, **M. Yu. Tkachenko**, A. V. Shestopalova // Biopolymers and Cell. – 2010. – V. 26, № 5. – P. 360-372. doi.org/10.7124/bc.00016A
3. Boryskina O. P. Protein-DNA complexes: specificity and DNA readout mechanisms / O. P. Boryskina, **M. Yu. Tkachenko**, A. V. Shestopalova // Biopolymers and Cell. – 2011. – V. 27, № 1. – P. 3-16.
4. 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 / **M.Yu. Zhitnikova**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2014. – V. 32, № 10. – P. 1670-1685.
5. Шестопалова А. В. Полиморфизм ДНК и проблема белково-нуклеинового узнавания / А. В. Шестопалова, **М.Ю.Житникова**, Е.П. Борискина // монография, LAP: Lambert Academic Publishing, Saarbrucken, Germany. – 2014. – С. 112.
6. Zhitnikova M.Yu. Nucleosome as an example of a nanosystem formation: structural dynamics of nucleosomal DNA / **M.Yu. Zhitnikova**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova // Chapter 4. In book: “Nanobiophysics: Fundamentals and Applications”, Pan Stanford Publishing, CRC press, Taylor & Francis Group, NY. – 2015. – P. 95-128.

7. Tkachenko M.Yu. ProtNA-ASA: Protein-Nucleic Acid Structural Database with Information on Accessible Surface Area / **M.Yu. Tkachenko**, M.Ye. Tolstorukov, A.V. Shestopalova // Book of abstracts of the NATO advanced Research Workshop “Molecular Self-Organization in Micro-, Nano. And Macro Dimensions: From Molecules to Water, to Nanoparticles, DNA and Proteins”. – Kyiv (Ukraine), 8-12 June 2008. – P. 195-196.
8. Tkachenko M.Yu. Indirect mechanisms of protein-nucleic-acid recognition: analysis of ProtNa-ASA structural database / **M.Yu. Tkachenko**, O.P. Boryskina, M.Ye. Tolstorukov, A.V. Shestopalova // Book of abstracts of the VIII-th Kharkov Young Scientist Conference “Radiophysics and Electronics, Biophysics”. –Kharkov (Ukraine), 25-27 ноября 2008. – P. 154.
9. Ткаченко М.Ю. Исследование роли альтернативных конформаций торсионного угла гамма сахарофосфатного остова ДНК в белково-нуклеиновом узнавании / **М.Ю. Ткаченко**, Е.П. Борискина, А.В. Шестопалова, М.Е. Толсторуков // Сборник тезисов V Международной научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” БФФХ–2009. – Севастополь (Украина), 21-26 апреля 2009. – С. 141-143.
10. Ткаченко М.Ю. Доступная поверхность ДНК в различных конформациях сахаро-фосфатного остова: значение для непрямого белково-нуклеинового узнавания / **Ткаченко М.Ю.**, Е.П. Борискина, А.В. Шестопалова, М.Е. Толсторуков // Сборник тезисов 2-й Всеукраинской научной конференции молодых ученых “Физика низких температур КМВ-ФНТ-2009”. – Kharkov (Ukraine), 1-5 июня 2009. – P. 91.
11. Tkachenko M.Yu. Role of gamma torsion angle of sugar-phosphate DNA backbone transitions in mechanisms of indirect readout / **M.Yu. Tkachenko**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova, M.Ye. Tolstorukov // Сборник тезисов XII Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI Века”. – Пущино (Россия), 28 сентября – 2 октября 2009. – С. 45-46.
12. Tkachenko M.Yu. Conformational Transitions of α/γ Torsion Angles of the DNA Backbone in Nucleosome / **M.Yu. Tkachenko**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova, M.Ye Tolstorukov // Book of abstracts of the IX-th Kharkov Young Scientist Conference “Radiophysics and Electronics, Biophysics”. – Kharkov (Ukraine), 1-3 December 2009. – P. 127.
13. Ткаченко М.Ю. Положение и сиквенс-специфичность конформаций торсионных углов альфа и гамма сахарофосфатного остова ДНК в нуклеосоме / **М. Ю. Ткаченко**, Е.П. Борискина, А.В. Шестопалова, М.Е. Толсторуков // Сборник тезисов VI Международной научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” БФФХ – 2010. – Севастополь (Украина), 26-30 апреля 2010. – С. 155-158.
14. Tkachenko M.Yu. Gamma angle transitions in nucleosomal DNA backbone: significance for protein–DNA recognition / **M.Yu. Tkachenko**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova, M.Ye. Tolstorukov // Book of abstracts of the 4th ESF Conference on Functional Genomics & Disease. – Dresden (Germany), 14-17 April 2010. – V. 27, S1, P. S24.

15. Шестопалова А.В. Механизмы белково-нуклеинового узнавания и конформационная динамика ДНК / А.В. Шестопалова, Е.П. Борискина, **М.Ю. Ткаченко**, М.Е. Толсторуков // Сборник тезисов VII Международной научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” БФФХ – 2011. – Севастополь (Украина), 26-30 апреля 2011. – С.150-151.
16. Житникова М.Ю. Роль альтернативних конформацій сахарофосфатного кістяку ДНК в нуклеїново-білковому впізнаванні / О.П. Борискіна, **М.Ю. Житникова**, Г.В. Шестопалова // Тези V з'їзду Українського біофізичного товариства. – Луцьк (Україна), 22-25 июня 2011. – С. 27-28.
17. Борискіна О.П. Конформаційна динаміка сахарофосфатного кістяка ДНК у складі нуклеосом / О.П. Борискіна, **М.Ю. Житнікова**, Г.В. Шестопалова // Тези V з'їзду Українського біофізичного товариства. – Луцьк (Україна), 22-25 июня 2011. – С. 28.
18. Shestopalova A.V. Nucleosome as an example of a nanosystem formation: structural dynamics of nucleosomal DNA / A.V. Shestopalova, E.P. Boryskina, **M.Yu. Zhitnikova**, M.Ye. Tolstorukov // Book of abstracts of the II International Conference “Nanobiophysics 2011: fundamental and applied aspects”. – Kiev (Украина), 6-9 October 2011. – P. 118.
19. Zhitnikova M.Yu. Transitions of the γ angle in the sugar-phosphate DNA backbone and indirect protein-DNA recognition / **M.Yu. Zhitnikova**, E.P. Boryskina, A.V. Shestopalova // Book of abstracts of the International Conference “Problems of Theoretical Physics”. – Kyiv (Ukraine), 8-11 October 2012. – P. 30.
20. Zhitnikova M.Yu. Some physical principles of nanosystems' formation on the example of protein-DNA recognition / **M.Yu. Zhitnikova**, O.P. Boryskina, A.V. Shestopalova // Book of abstracts of the III International Conference “Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects”. – Kharkiv (Ukraine), 7-10 October 2013. – P. 38.
21. Zhitnikova M.Yu. Analysis of distribution of electrostatic potential in a minor groove of DNA double helix / **M.Yu. Zhitnikova** // Book of abstracts of the V International Conference Low Temperature Physics (ICYS-LTP-2014). – Kharkov (Ukraine), 2-6 June 2014. – P. 146.
22. Zhitnikova M.Yu. Influence of conformational rearrangements of sugar-phosphate backbone on the electrostatic potential of DNA minor grooves in aspect of protein-DNA recognition / **M.Yu. Zhytnikova**, A.V. Shestopalova // Book of abstracts of the IV International Conference “Nanobiophysics 2015: fundamental and applied aspects”. – Kiev (Украина), 1-4 October 2015. – P. 18.

АНОТАЦІЯ

Житнікова М.Ю. Конформації цукрофосфатного остову ДНК та білково-нуклеїнове впізнавання. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2017.

Методами структурної біоінформатики 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 сиквенс-специфічність, які можуть бути розглянуті як фактори, важливі для реалізації непрямого механізму білково-нуклеїнового впізнання.

Ключові слова: ДНК, білково-нуклеїнові комплекси, непряме білково-нуклеїнове впізнання, конформації цукрофосфатного остову, полярно-гідрофобний профіль жолобків

АННОТАЦИЯ

Житникова М.Ю. Конформации сахарофосфатного остова ДНК и белково-нуклеиновое узнавание. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Харьков, 2017.

Методами структурной биоинформатики выполнен детальный анализ кристаллографических структур фрагментов свободной ДНК, белково-нуклеиновых комплексов и нуклеосом, что позволило определить влияние конформационных перестроек сахарофосфатного остова ДНК на размеры и физические характеристики двойной спирали и их сиквенс-специфичность, которые могут быть рассмотрены как факторы, важные для реализации непрямого механизма белково-нуклеинового узнавания.

Ключевые слова: ДНК, белково-нуклеиновые комплексы, не прямое белково-нуклеиновое узнавание, конформации сахарофосфатного остова, полярно-гидрофобный профиль желобков.

SUMMARY

Zhitnikova M.Yu. Conformations of the sugar phosphate backbone of DNA and protein-DNA recognition. – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of Candidate of Science in Physics and Mathematics by specialty 03.00.02 – biophysics. V.N. Karazin Kharkiv national university, Kharkiv, 2017.

We created the new database (ProtNA-ASA) which combines the data on conformational parameters of nucleic acids and calculations of the accessible surface area of nucleic acid atoms in protein – DNA complexes. The database provides structural parameters describing local geometry of base pairs and base-pair steps, as well as backbone torsion angles. Additionally, entire ASA of DNA atoms and the accessible area of atoms in the minor and major grooves were calculated. ProtNA-ASA database enables one to study the sequence specificity of the influence of DNA conformation on availability of atoms for contact either in major or in minor groove, which is important

for understanding of the principles of molecular recognition including indirect sequence readout.

Variations of the shape and polarity of the DNA grooves caused by changes of the DNA conformation play an important role in the DNA readout. Despite the fact that non-canonical conformations of the sugar-phosphate DNA backbone are frequently found in the DNA crystal structures, their possible role in the DNA recognition has not been studied systematically. In order to fill this gap, we analyze the available high-resolution crystal structures of the naked and complexed DNA.

The detailed analysis of crystallographic structures of the free DNA fragments, the protein-nucleic acid complexes and the nucleosomal DNA allow us to determine the influence of sugar-phosphate DNA transitions (switching of the γ angle (O5'–C5'–C4'–C3') from canonical to alternative conformations and/or C2'-endo $\rightarrow$ C3'-endo transition of deoxyribose) on the structural and physical characteristics of the DNA double helix and their sequence specificity, which can be considered as factors important for indirect protein-DNA recognition.

We have shown that the non-canonical γ angle conformations are present both in the naked and bound DNA. They are found more often in the bound DNA than in the naked one and in the nucleotides with the A-like sugar pucker than with the B-like one. The A-like nucleotides adopt only one alternative *trans* state, contrary the B-like nucleotides populate both alternative conformations. The alternative angle γ torsions are more frequently observed in the purines with the A-like sugar pucker and in the pyrimidines with the B-like sugar conformation.

We have demonstrated that the structural adjustments of the DNA double helix (the conformations of the sugar-phosphate backbone and the minor groove dimensions) induce changes in the distribution of the minor groove electrostatic potential and are sequence-specific. Therefore, these features of the minor groove sizes and distribution of minor groove electrostatic potential can be used as a signal for recognition of the target DNA sequence by protein in the implementation of the indirect readout mechanism.

Our results imply that the angle γ transitions are sequence-specific and contribute to the process of the protein–DNA recognition due to modification of the polar/hydrophobic profile of the DNA grooves. The purine nucleotides with all types of the angle γ conformations show a higher polar/hydrophobic ratio in the major groove than the pyrimidines due to the differences of accessibility of the polar and hydrophobic surfaces of the bases in both naked and bound DNA. In particular, we have followed the changes of accessibility of the O3', O5', and C5' atoms that often interact with proteins. In the nucleotides with both alternative angle γ conformation the accessibility of the O3' and O5' atoms in the minor groove atoms is increased while the accessible surface of the C5' atom decreases. On the contrary, in the major groove the atom C5' becomes more exposed.

The propensity of the nucleotides with different γ angle conformations to participate in the protein–nucleic acid contacts in the minor and major grooves is connected with their sugar pucker and are sequence-specific. The A-like flipped nucleotides generally show a higher percentage of interacting nucleotides as well as a greater number of protein–nucleic acid contacts in the minor groove than the B-like

nucleotides with the same angle γ conformation, while the B-like ones show a greater number of contacts per interacting nucleotide in the major groove.

The analysis of nucleosomal DNA shows high percent of nucleotides with alternative γ angle. Such “switched” nucleotides are located on the outer surface or uniformly on the inner and the outer surface of nucleosomes. Moreover, we have found “conservative” positions of the alternative nucleotides. Such conformational transitions are observed in more than 70% of investigated nucleosomes and can be caused by the superhelix formation. Moreover, such switched nucleotides can be used by protein-DNA recognition of non-histone proteins.

Therefore, variations of the shape, polarity and electrostatic potential of the DNA grooves caused by changes of the DNA sugar-phosphate conformation can play an important role in the DNA indirect readout. Our findings imply that the γ angle and/or deoxyribose transitions should be accounted for as the factors important for the protein–DNA indirect recognition, from the early stage discrimination of the correct target to fine-tuning of the interacting compounds during complexation.

Keywords: DNA, protein-DNA complexes, indirect protein-DNA recognition, conformation of the sugar-phosphate DNA backbone, polar/hydrophobic profiles of the DNA grooves.